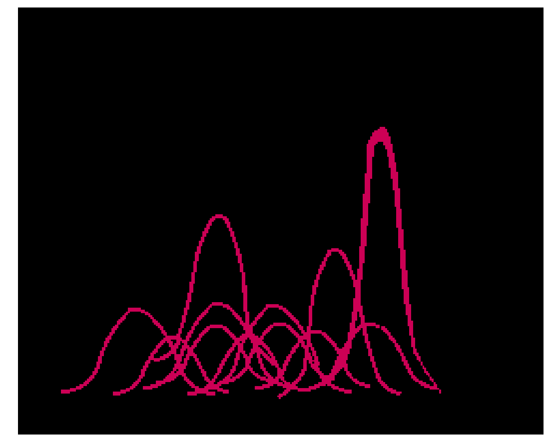
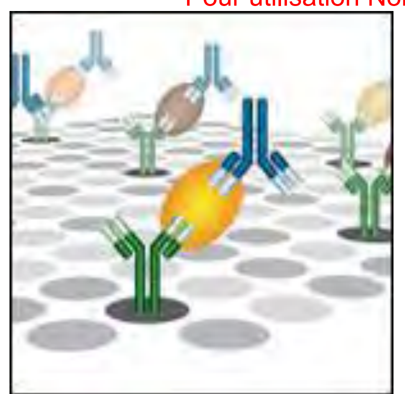




Réactions de précipitation
Réactions d'agglutination

Méthodes immunologiques sans marqueurs

Présenté par: Dr CHERGUELAÏNE. K
Cherg.khaled@gmail.com

Plan:

I-Introduction:

II- Rappels sur la réaction antigène-anticorps et ses applications

III- Réactions de précipitation:

- en milieu liquide.
- en milieu gélifié.

IV. Réactions d'agglutination:

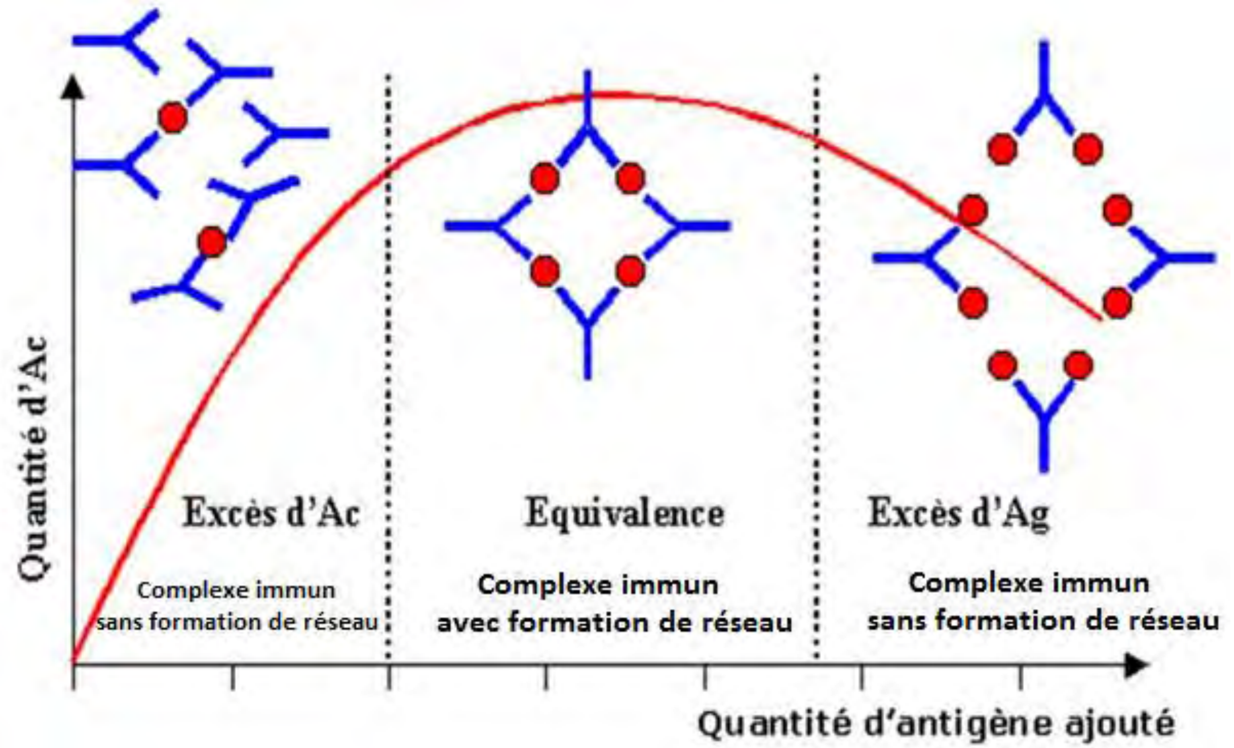
- agglutination directe ou active
- agglutination indirecte ou passive
- inhibition d'agglutination

V- Conclusion:

I. Introduction

On regroupe sous le terme de méthode immunochimiques toutes les méthodes se basant sur la mise en évidence du complexe qui se forme lors de la réaction Ag – Ac.

Ces techniques sont utilisées pour détecter et eventuellement quantifier, soit des antigènes, soit des anticorps.



II. Intéraction Ag-Ac (Rappels)
1. Caractéristiques

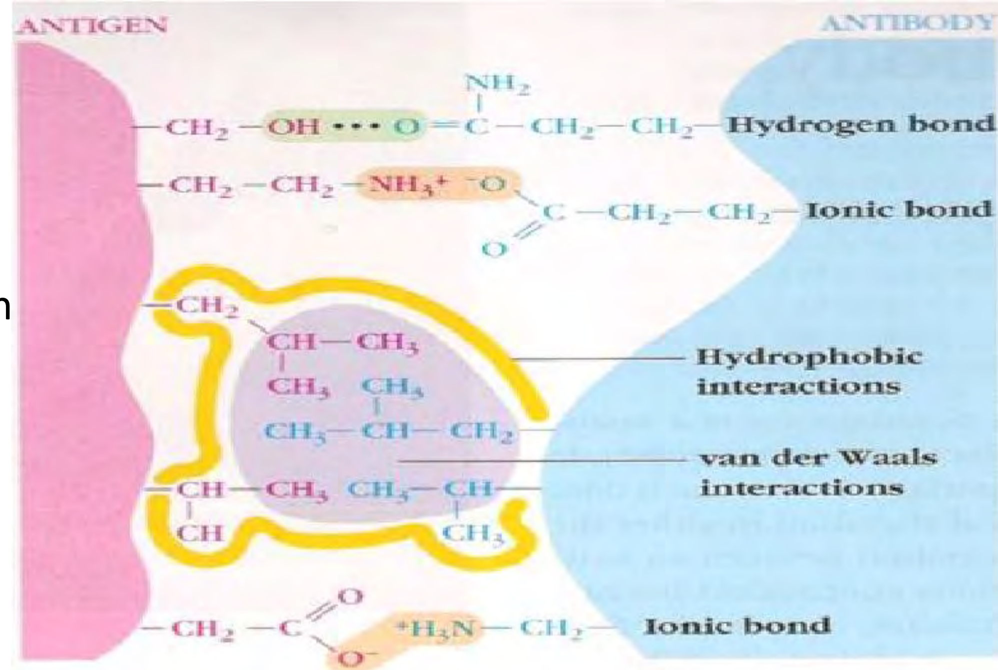
1. La réaction antigène-anticorps est très rapide, de l'ordre de quelques secondes, est réversible (**liaisons non covalentes**) de faible énergie.

$$Ag + Ac \overset{k_1}{\underset{k_2}{\longleftrightarrow}} \text{complexes Ag-Ac}$$

La loi d'action de masse est respectée, la constante $K = k_1/k_2$ permet de définir l'affinité d'un anticorps pour son antigène.

2. Quatre types de forces sont mises en jeu dans la liaison Ag-Ac .Ce sont, de la plus forte à la plus faible: :
   1) **forces électrostatiques** ou **ioniques.**
   2) **liaisons hydrogènes.**
   3) **Liaisons hydrophobes**
   4) **forces de Van der Waals**

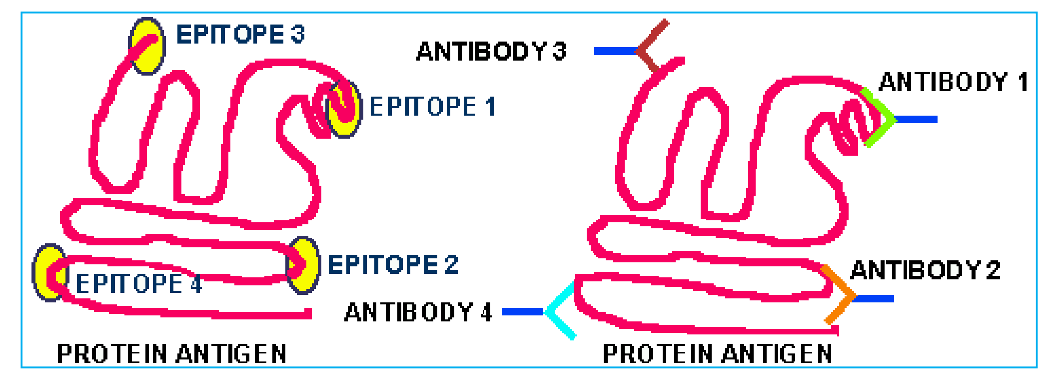
on mesure l'affinité d'un anticorps pour son antigène, par la mesure de la somme des forces attractives et répulsives.



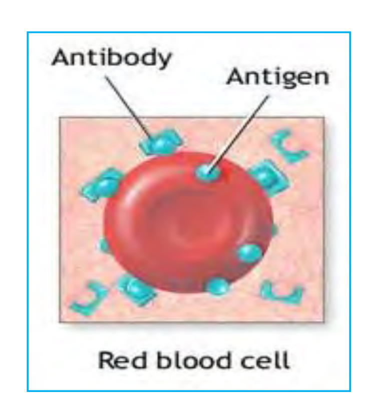
3. la spécificité de la réaction est due à la **complementarité structurale**.**elle** est trés élevée mais pas absolue
→ ***Réaction croisée***

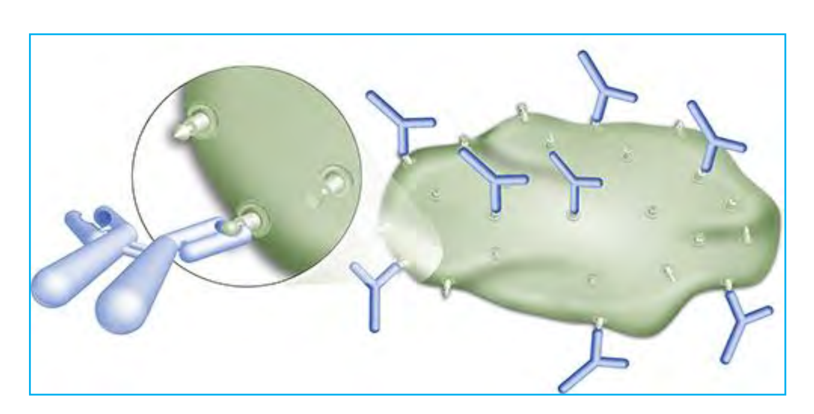
II. Intéraction Ag-Ac (Rappels)
1. Caractéristiques

Si l'antigène est ***moléculaire*** et ***soluble***; les complexes Ag/Ac forment un **précipité**.



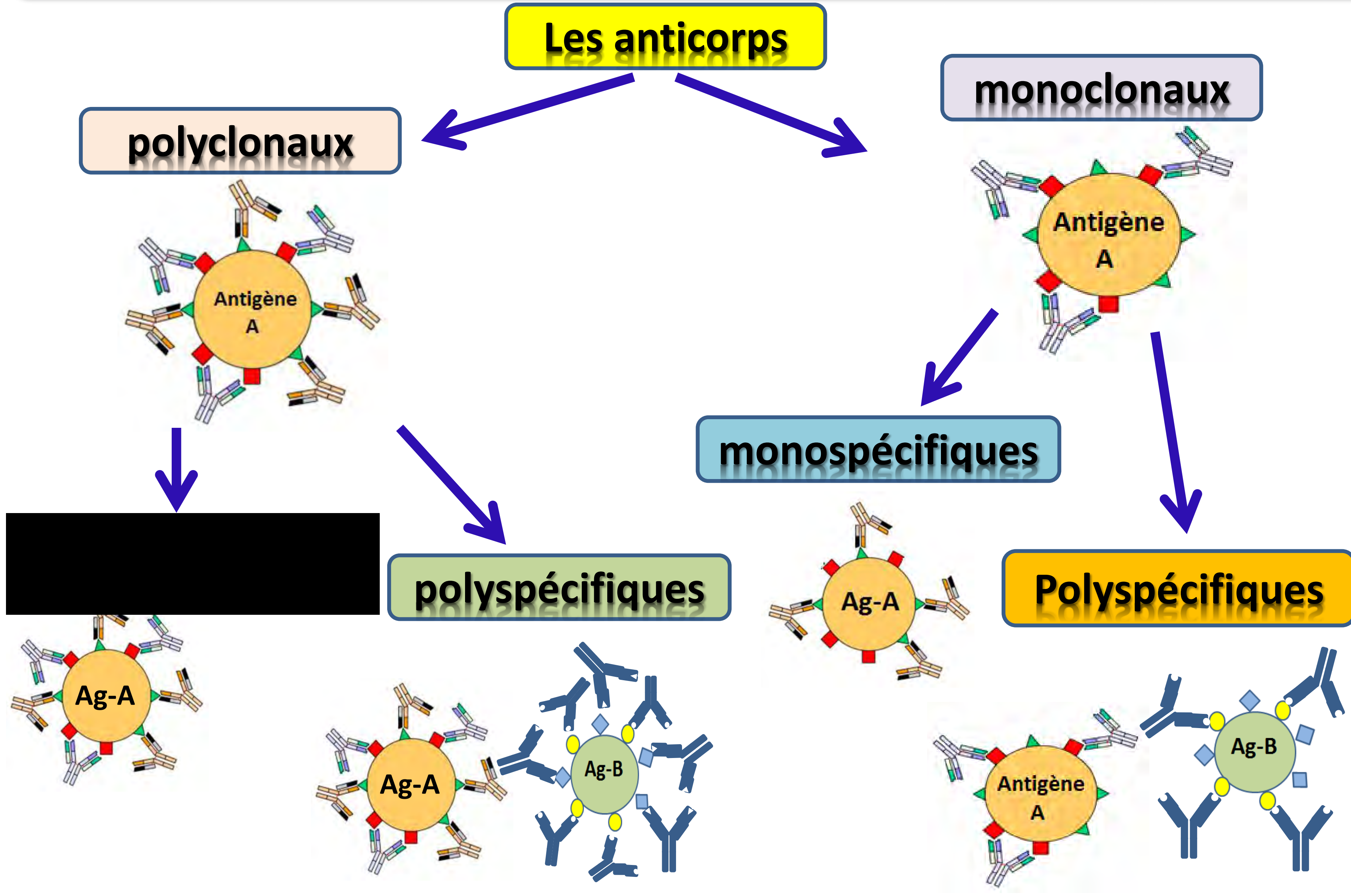
Si l'antigène est ***particulaire*** ou ***cellulaire*** (bactéries, hématies, billes de latex …); les complexes immuns forment un **agglutinat**.





II. Intéraction Ag-Ac (Rappels)

3. Anticorps polyclonaux et monoclonaux



II. Intéraction Ag-Ac (Rappels)
3. Facteurs influençant

PH: modifie l' état d'ionisation des groupements de l'antigéne et de l'anticorps.

La température: en général ↑ de l'affinité avec↑ de la temperature.

***Les forces ionique*:** diminution des liaisons Ag-Ac avec ↑ des forces ioniques.

II. Intéraction Ag-Ac (Rappels)
4. Applications

les anticorps sont hautement spécifiques de leur antigène. Avec l'un on peut trouver l'autre.

deux grands types d'applications :

Détection et dosage de l'Ag

Détection et titrage de l'Ac

III. Differentes méthodes immunologiques

Techniques de précipitation

Techniques d'agglutination

- Techniques visibles

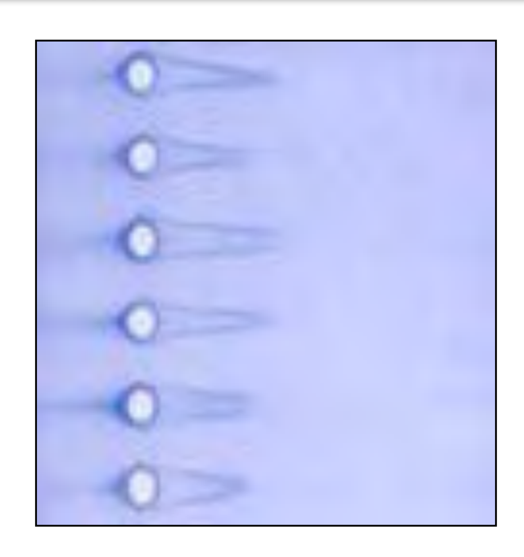
- Techniques non visibles

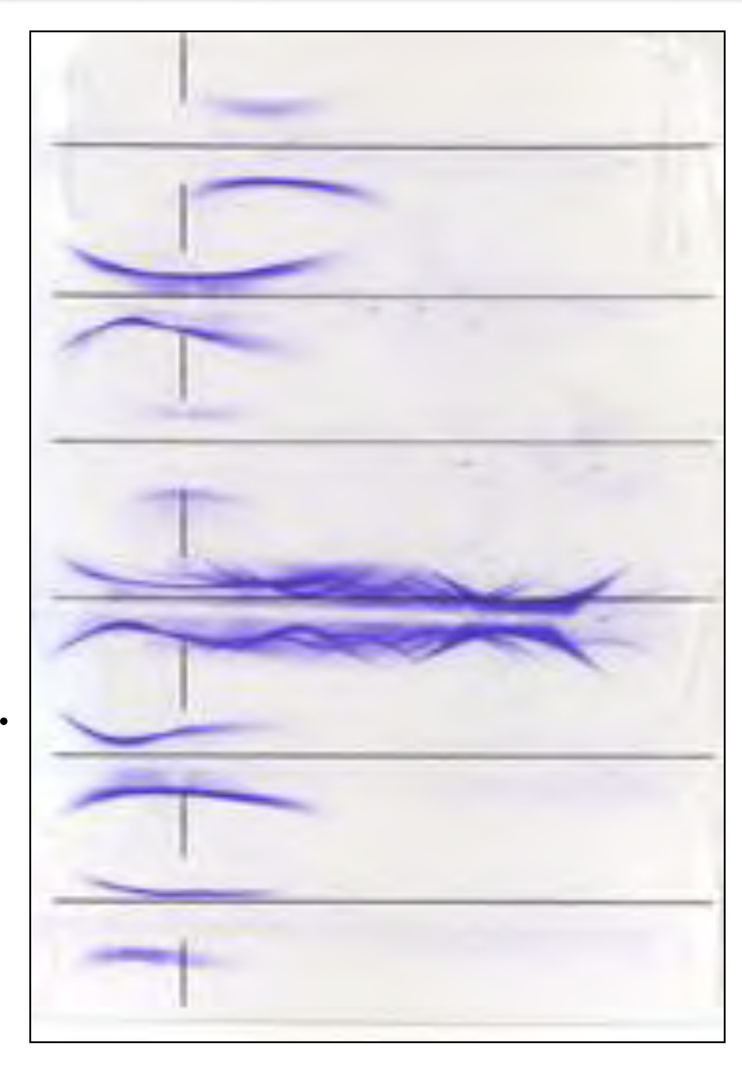
Techniques utilisant un marquage
(radio-isotopiques, enzymatiques, fluorescents et luminescents)

III. Réactions de précipitation

III. Techniques de précipitation







Antigène est ***moléculaire*** et ***soluble***; les complexes Ag/Ac forment un **<u>précipité</u>**.

Observation directe des effets de la réaction Ag-AC (visible à l'œil nu)

III. Techniques de précipitation

1.Précipitation en milieu liquide:

-Test de l'anneau (*ring test)*

-Néphélémétrie

-Turbidimétrie

2. Précipitation en milieu gélifié

-Immunodiffusion double:Ouchterlony

-Immunodiffusion radial:Mancini

-Électro-immunodiffusion de Laurell

-Electrosynerese

-Immunoélectrophorèse

-Immunofixation

III. Techniques de précipitation

Principe de l'Immuno-précipitation:

Réactions d'immuno- précipitation se déroulent en trois étapes :

1. Liaison de l'Ac au déterminant antigéniques
2. Formation d'un réseau par réarrangement des sites de liaison
3. Agrégation des réseaux et formation de précipité visible à l'oeil nu.

Caractéristiques de l'immuno-précipitation:

Ag: soluble

Ac: précipitine ou Ac polyclonaux

réseaux tridimensionnel (zone d'équivalence)

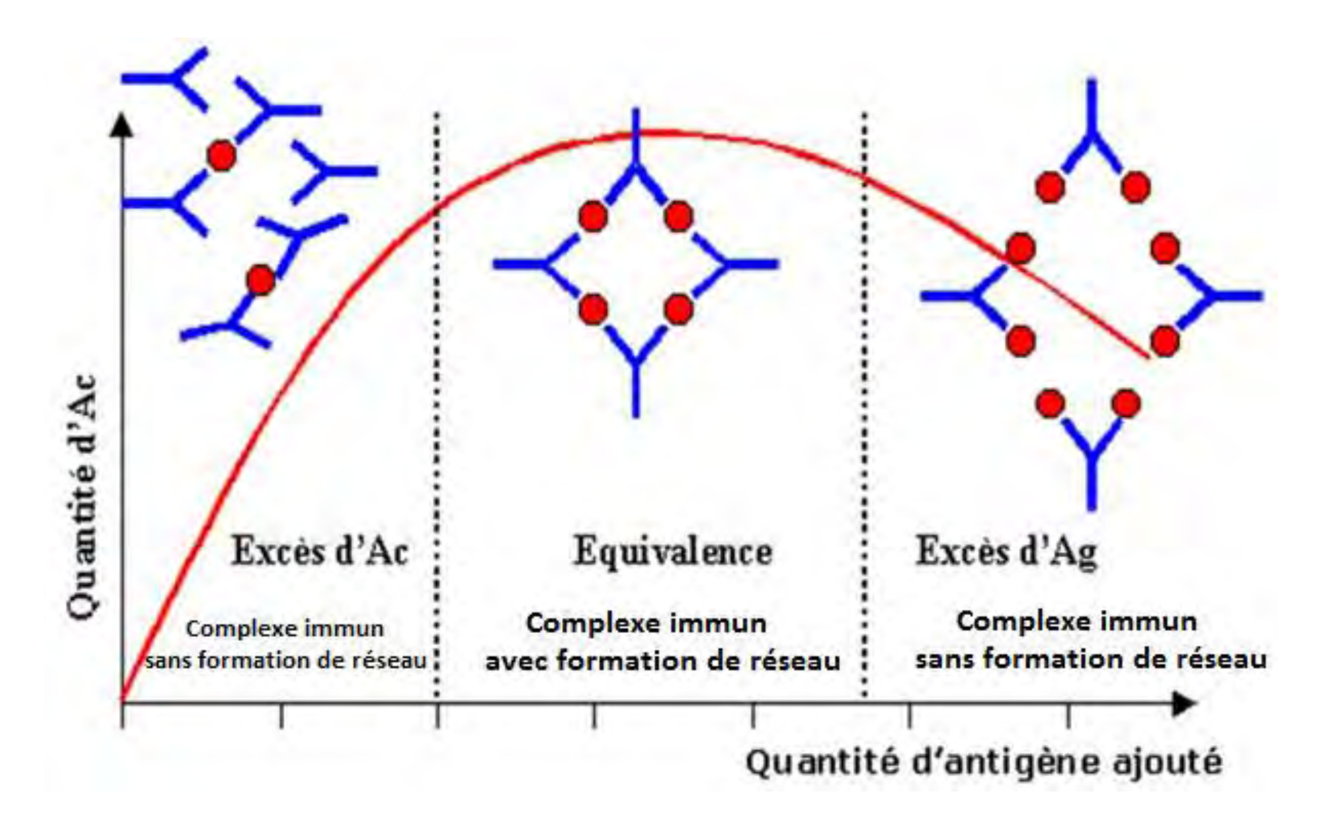
lecture : - œil nu

- turbidimétrie, néphélémétrie

III. Techniques de précipitation

méthode de Heidelberger et Kendall (1929)

Notion de courbe de précipitation :

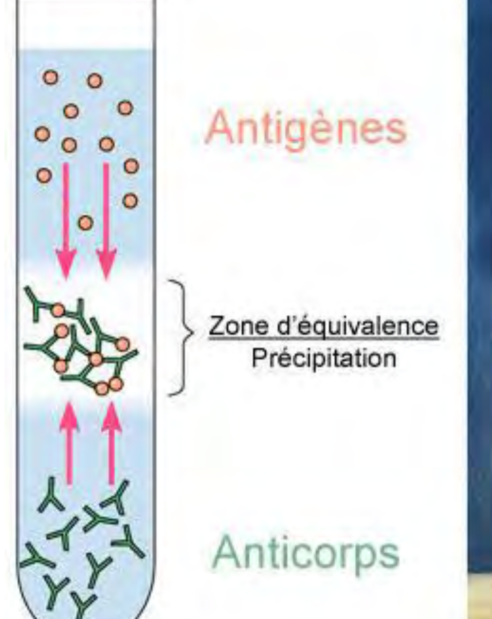


La ***zone d'équivalence*** (est le point où la courbe atteint son maximum) correspond à la formation d'un réseau Ag-Ac

III. Techniques de précipitation
1. En milieu liquide

1. Test de l'anneau (ring test)

C'est un test qualitatif. On introduit dans un tube des antigènes et des anticorps et on laisse reposer. Ils vont lentement diffuser dans le milieu, créant des gradients de concentration. Lorsqu'ils sont à l'**équivalence, c'est-à-dire** qu'il y a autant de paratope que d'épitopes, ils forment des complexes et précipitent.



Aplications:

Vérification après chaque injection d'allo-immunisation chez l'animal
Pour s'assurer d'en être dans la bonne voie

III. Techniques de précipitation
1. En milieu liquide

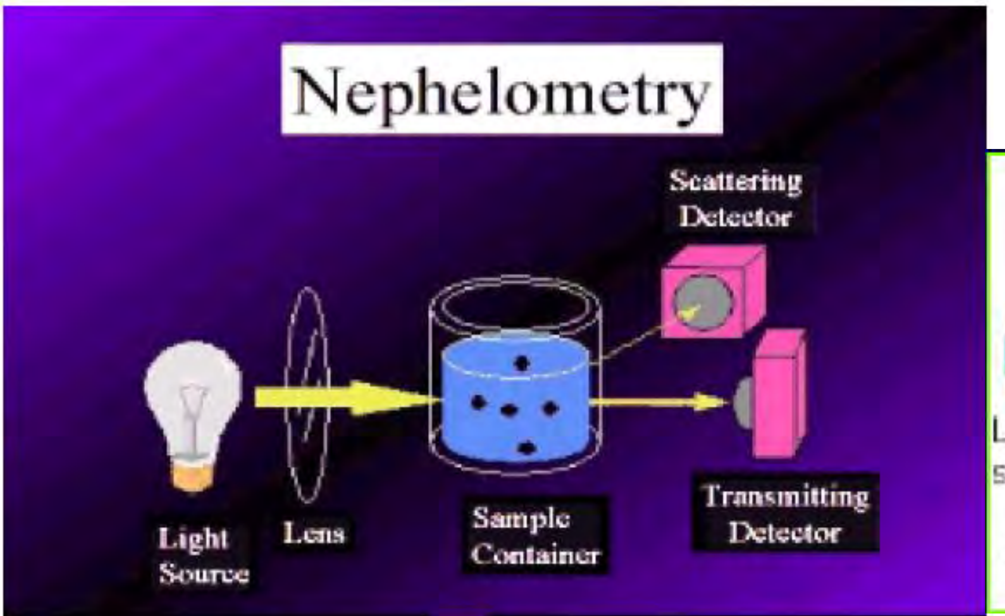
2. Techniques de néphélémétrie ou de turbidimétrie :

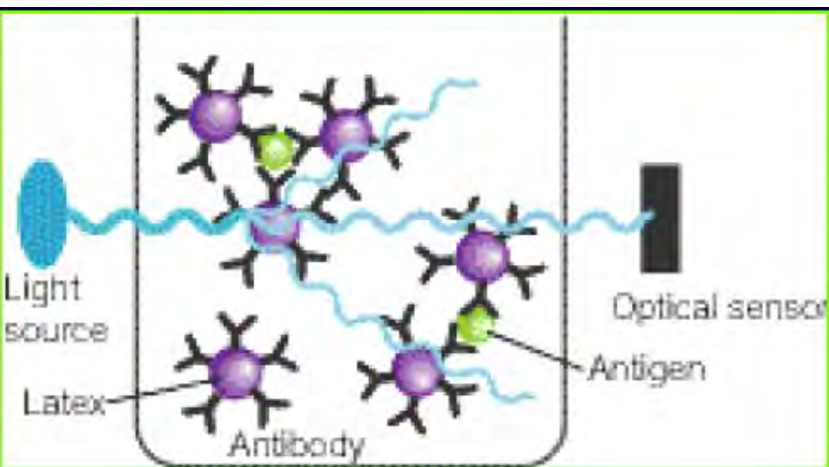
Un rayon laser traverse le tube contenant d'éventuelles précipité Ac/Ag.

La diffraction de la lumière par les précipité Ac/Ag (nephelos = nuage) est mesurée à la sortie.

Plus il y a de précipité Ac/Ag, plus il y aura de signal sur le photomultiplicateur (appareil qui mesure la diffraction).

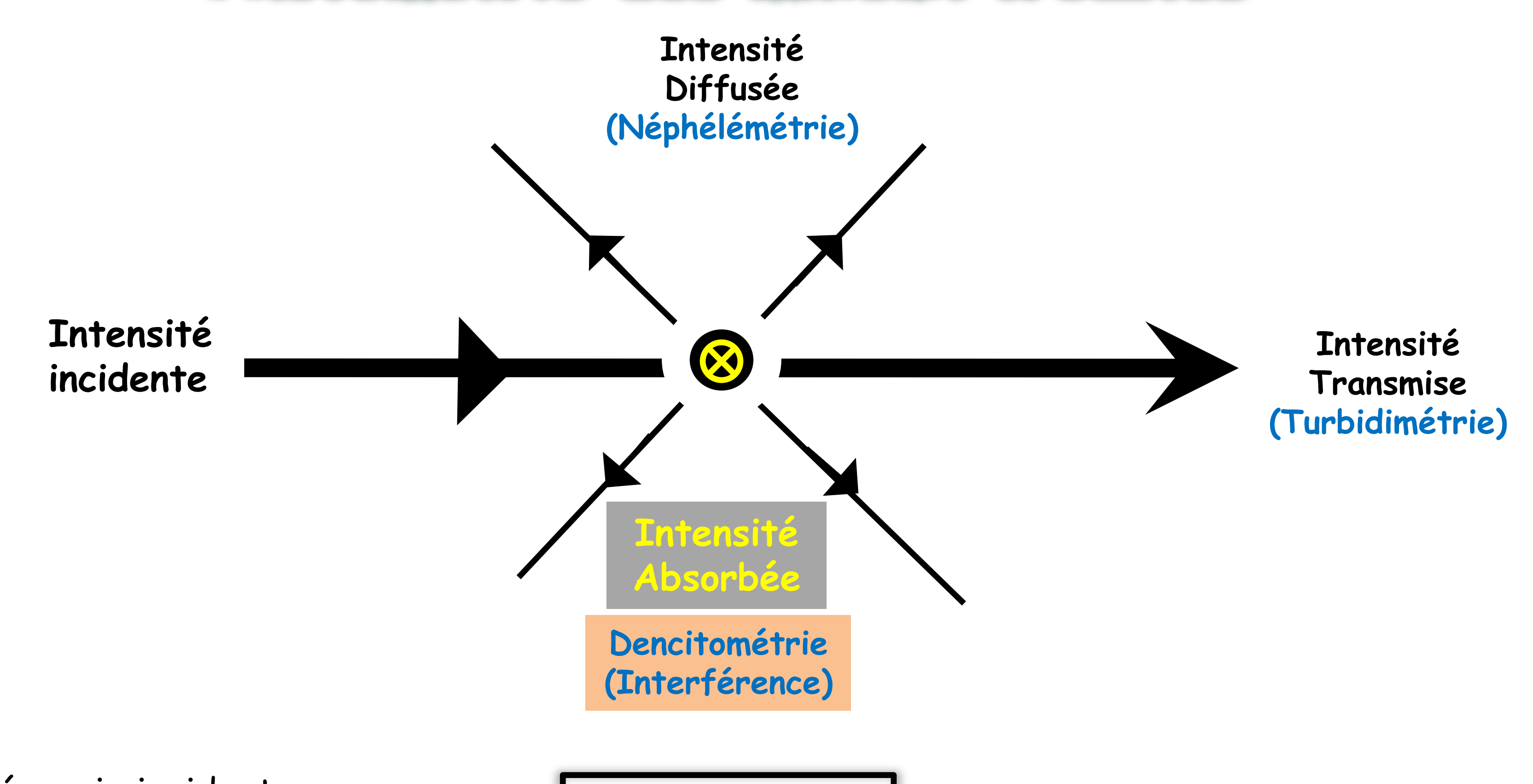
La mesure, rapide et automatisée, permet un dosage quantitatif. Cette technique permet aussi des mesures d'agglutinats.





III. Techniques de précipitation
1. En milieu liquide

Photométrie des milieux troubles

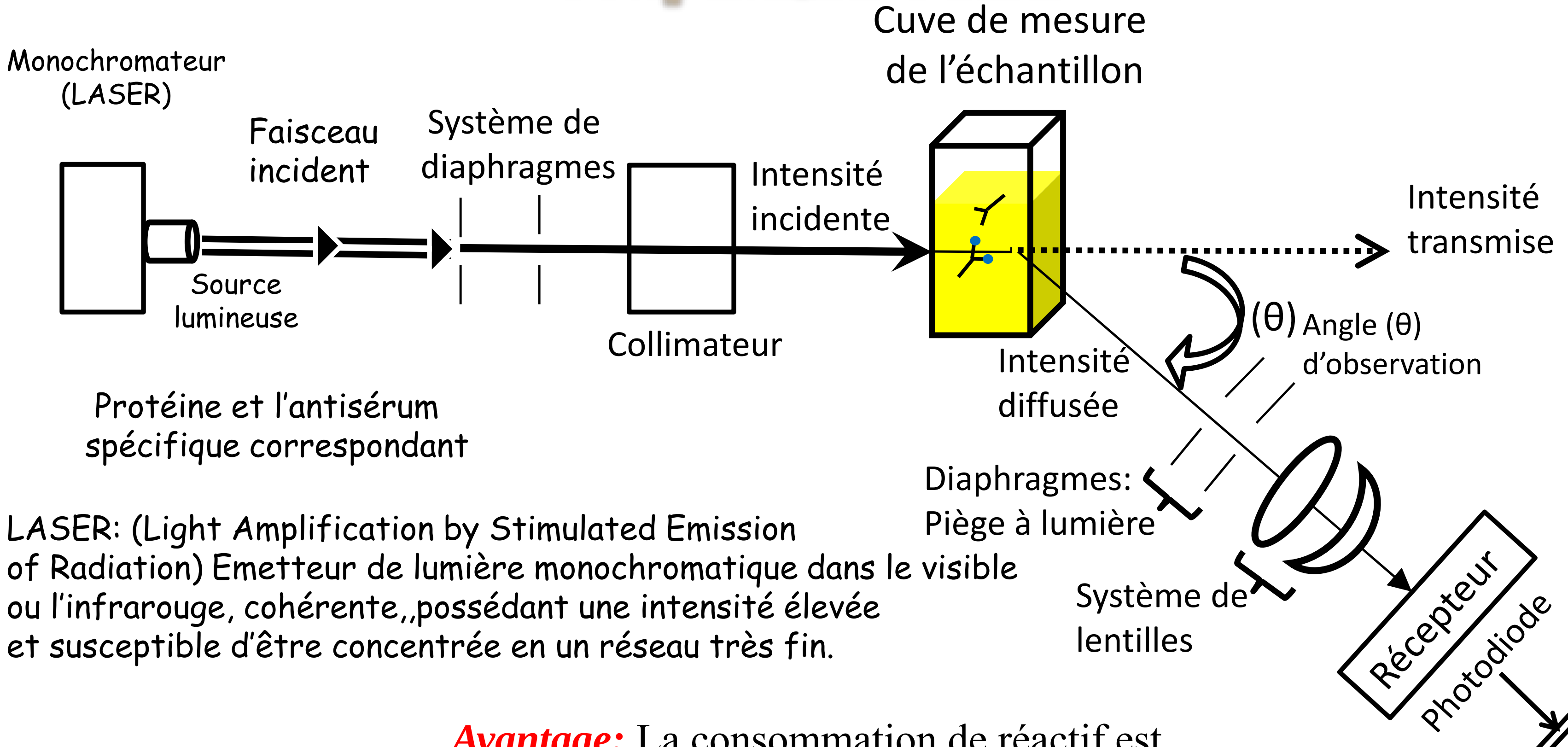


P_0: énergie incidente
P_a: énergie absorbée
P_t: énergie transmise
P_r: énergie réfléchie

$$P_0 = P_a + P_t + P_r$$

III. Techniques de précipitation
1. En milieu liquide

2. Néphélémétrie Laser



LASER: (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) Emetteur de lumière monochromatique dans le visible ou l'infrarouge, cohérente,,possédant une intensité élevée et susceptible d'être concentrée en un réseau très fin.

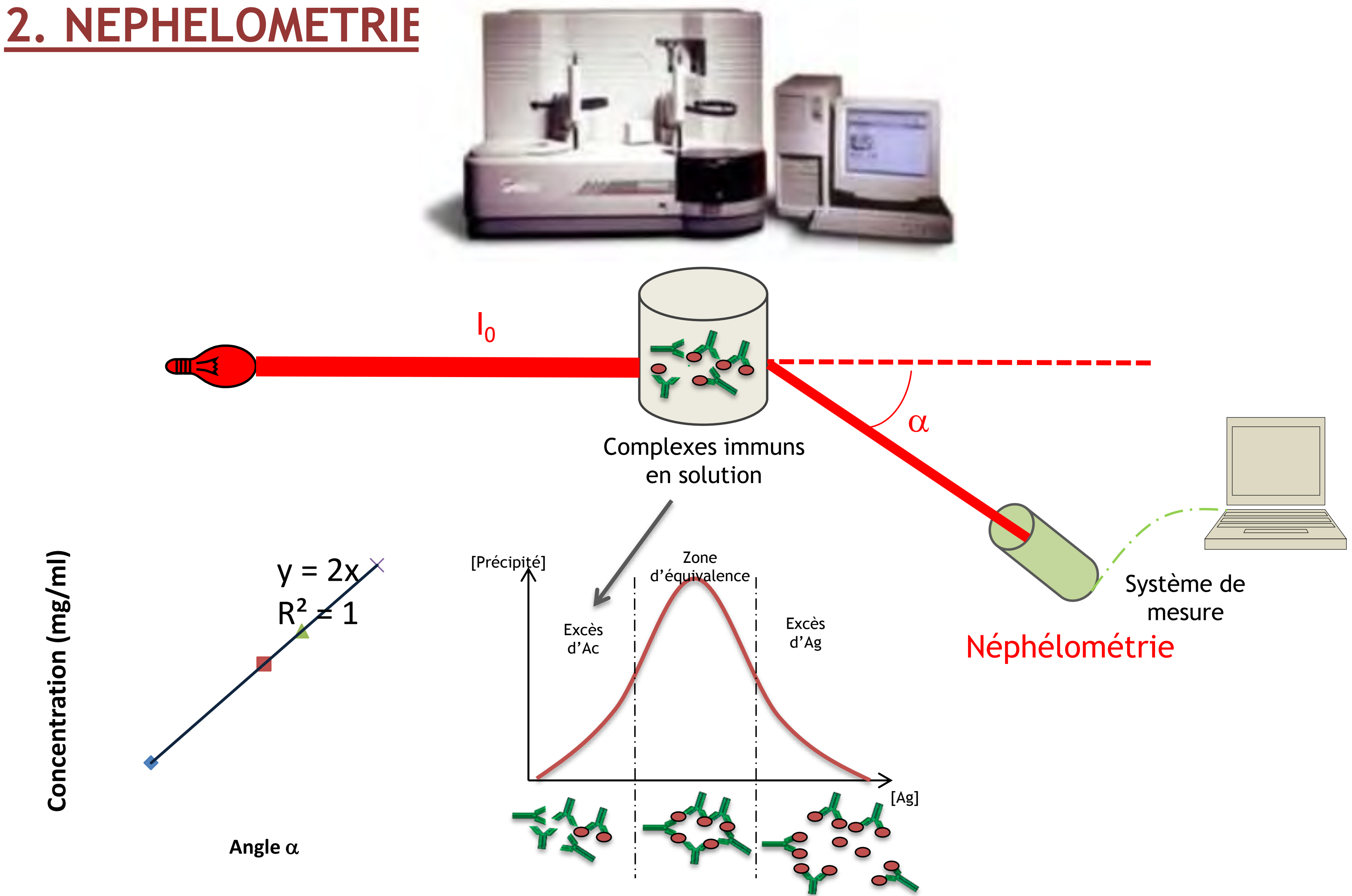
Avantage: La consommation de réactif est inferieur à celle de la turbidimétrie

Application: ***doser toutes les proteines dans les liquides biologiques*** Ig, complément, facteur rhumatoïde, PPS, PPR, PPU.

Sensibilité: 0.5g/l

III. Techniques de précipitation
1. En milieu liquide

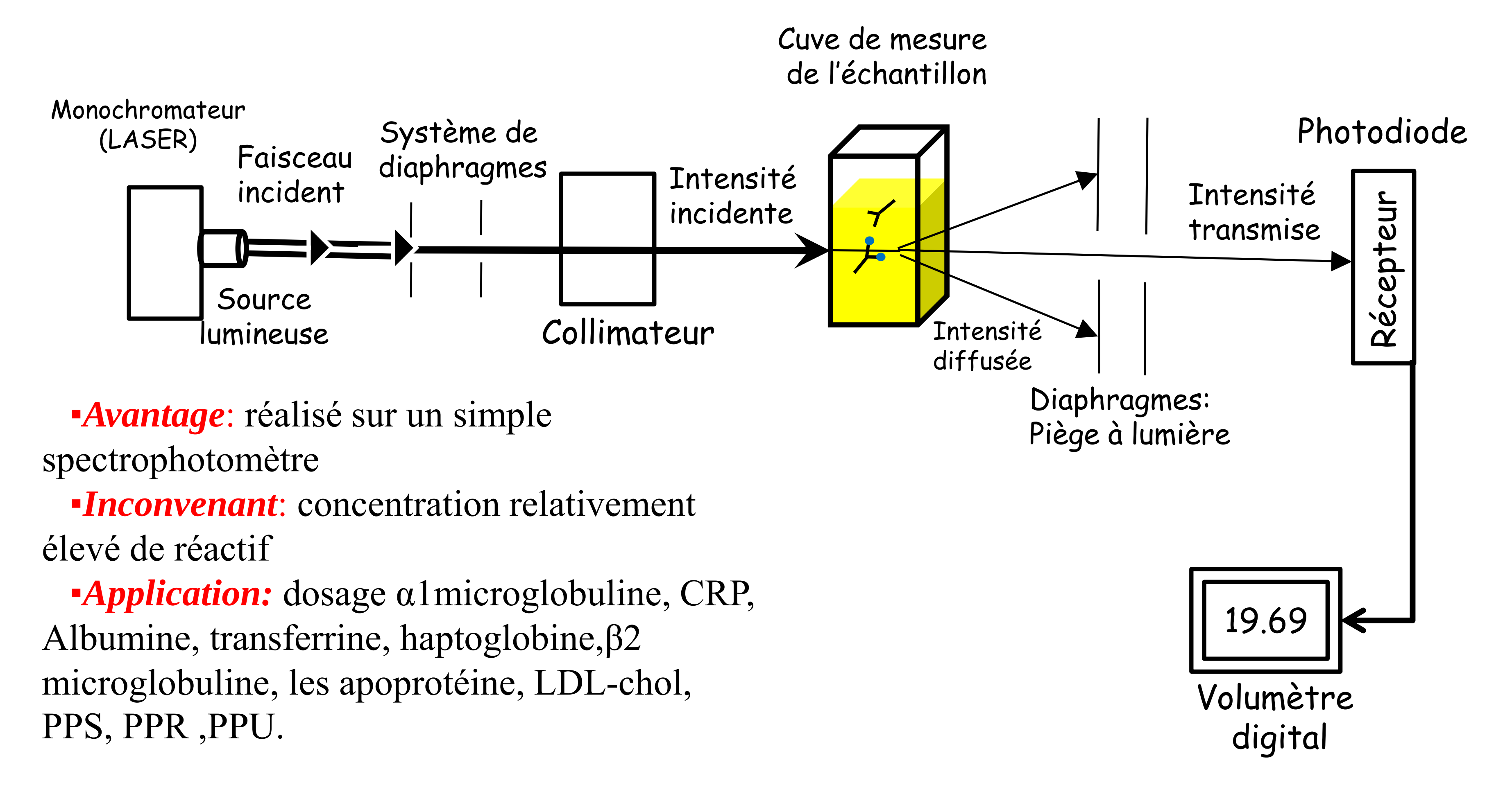
2. NEPHELOMETRIE



III. Techniques de précipitation
1. En milieu liquide

3. Turbidimétrie

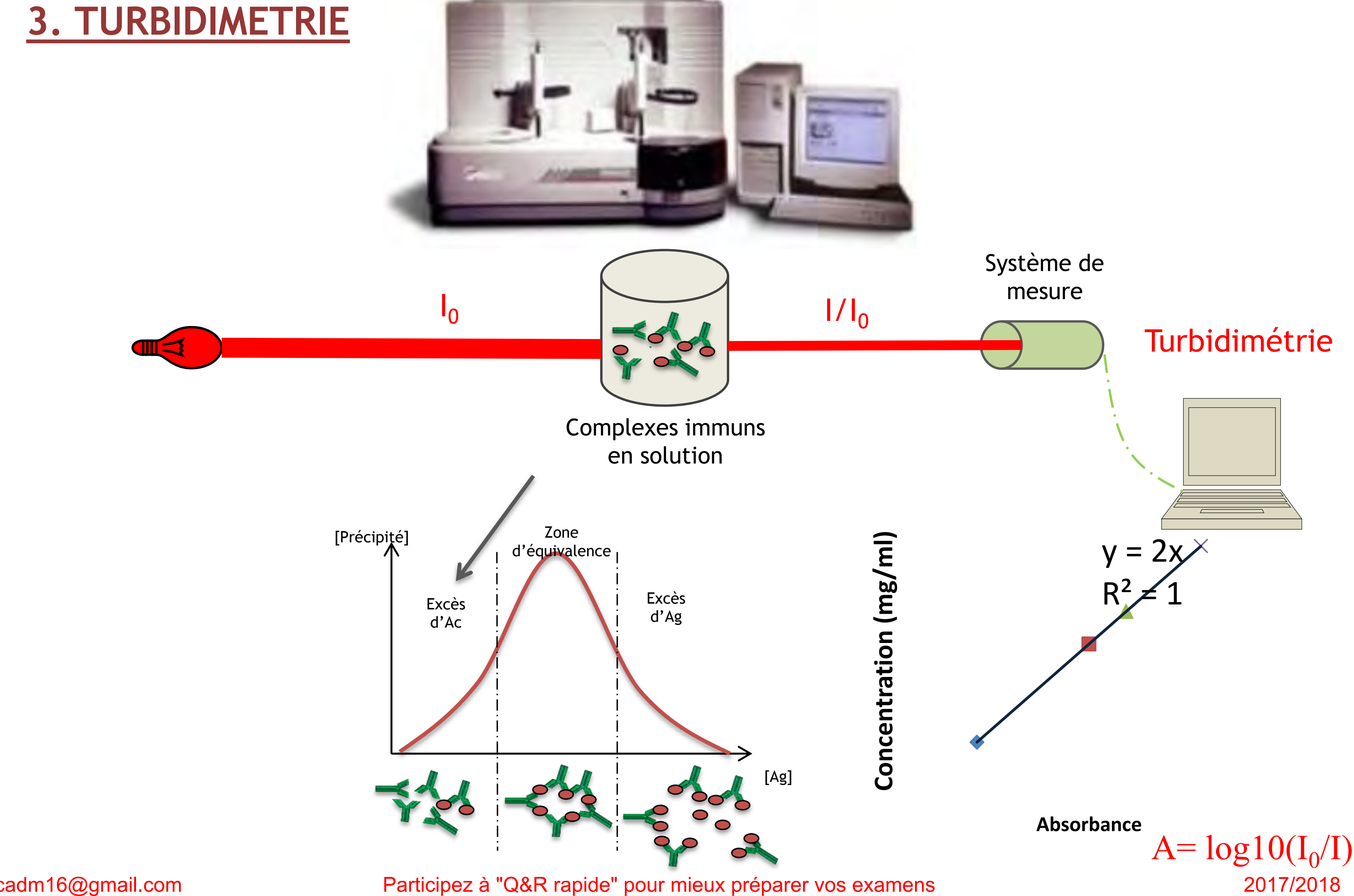
[redacted]é du faisceau directement transmis en éliminant la lumière diffusée dans la même direction.



- ***Avantage***: réalisé sur un simple spectrophotomètre
- ***Inconvenant***: concentration relativement élevé de réactif
- ***Application:*** dosage α1microglobuline, CRP, Albumine, transferrine, haptoglobine,β2 microglobuline, les apoprotéine, LDL-chol, PPS, PPR ,PPU.

III. Techniques de précipitation
1. En milieu liquide

3. TURBIDIMETRIE



$A = \log10(I_0/I)$

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

- Diffusion des réactants dans un milieu gelifie ➡ gradient de concentration
- A la zone d'équivalence ➡ Formation d'un précipite

Diffusion simple

Diffusion pulsé par un champ électriques

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

CARACTERISTIQUES DES GELS

Les gels d'Agarose sont issue de l'agar:

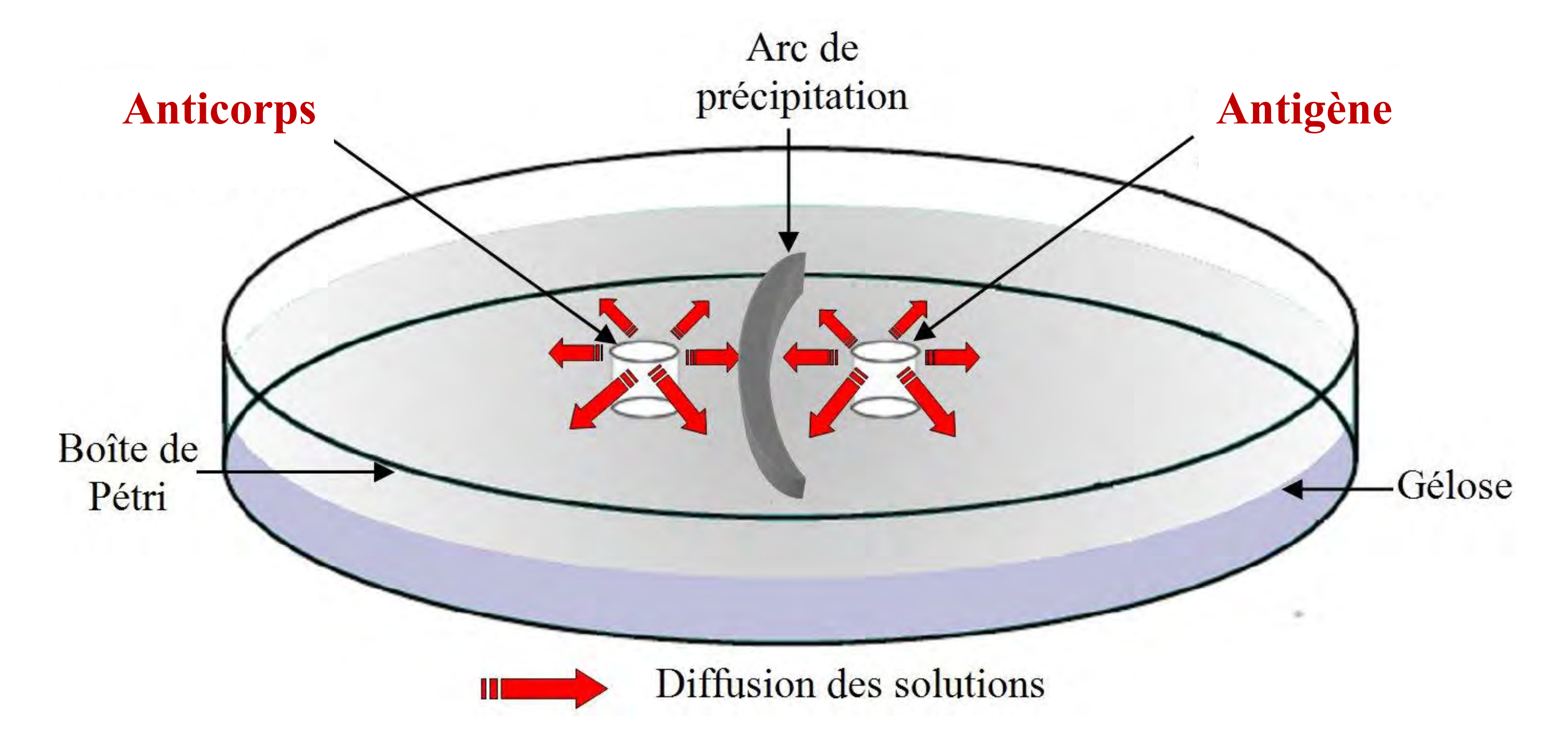
1. Inertes chimiquement.
2. Visqueux à 50°C ce qui permet d'inclure Ag et Ac sans qu'ils soient dénaturés.
3. Solides à 37°C.
4. Transparents, permettant l'observation des précipités.



III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

4. TEST D'OUCHTERLONY

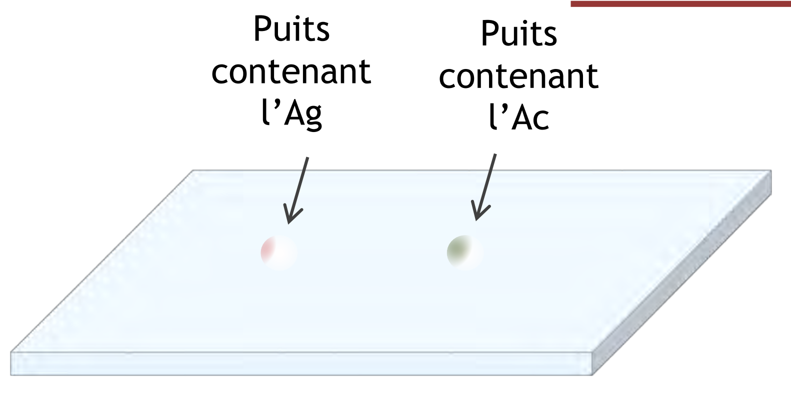
Diffusion double ▶ **Immunodiffusion double**



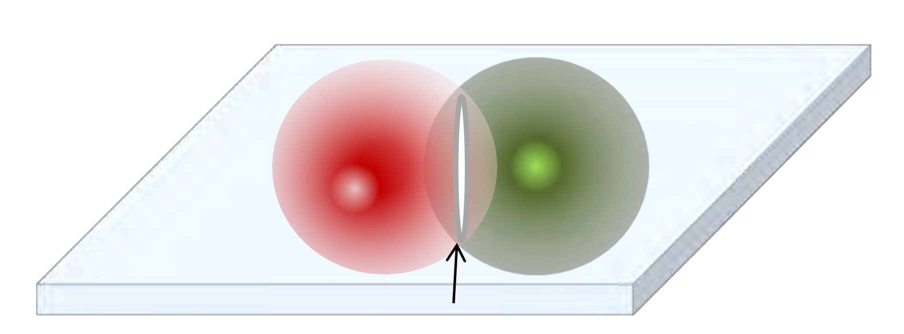
Technique qualitative

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

TEST D'OUCHTERLONY



Diffusion et formation de la ligne de précipitation



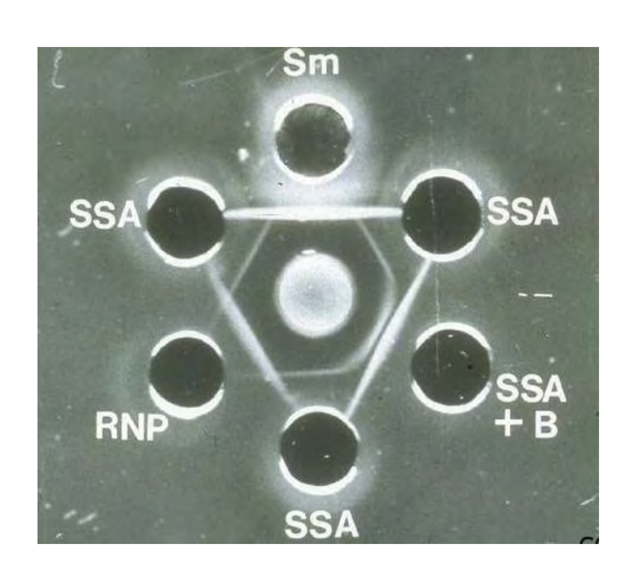
Ligne ou arc de précipitation dans la zone d'équivalence

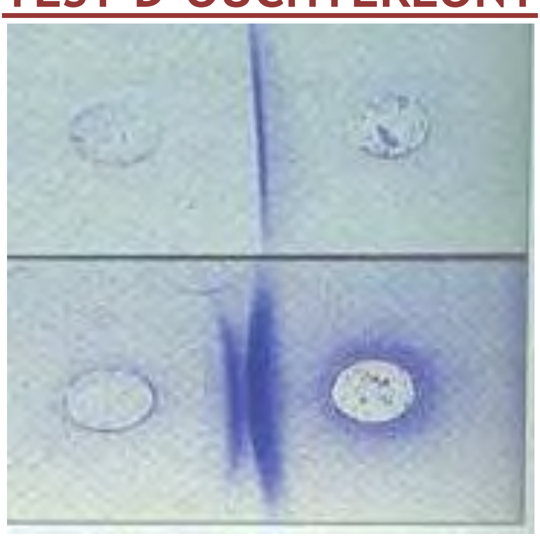


Exemple d'application : recherche de la protéine de Bence Jones

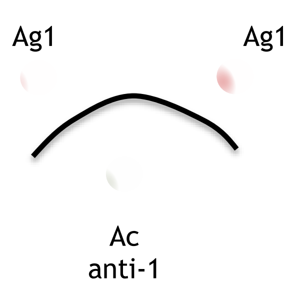
III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

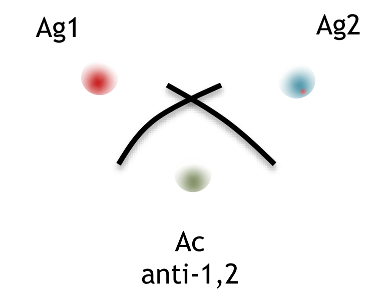
TEST D'OUCHTERLONY

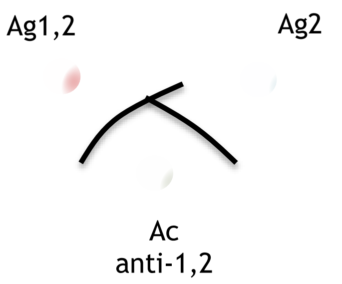












Identité totale

Ag1 et Ag2 présentent une identité immunochimique totale

Absence d'identité

Ag1 et Ag2 ne présentent aucune identité immunochimique

Identité partielle

Ag1 et Ag2 présentent une identité immunochimique Partielle

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

4. TEST D'OUCHTERLONY

Si les solutions d'Ag ou d'Ac sont complexes



Plusieurs arcs de précipitation

But:

- **Analyse qualitative des solution d'Ag ou d'Ac**
- **Étude des relations entre différents Ag**

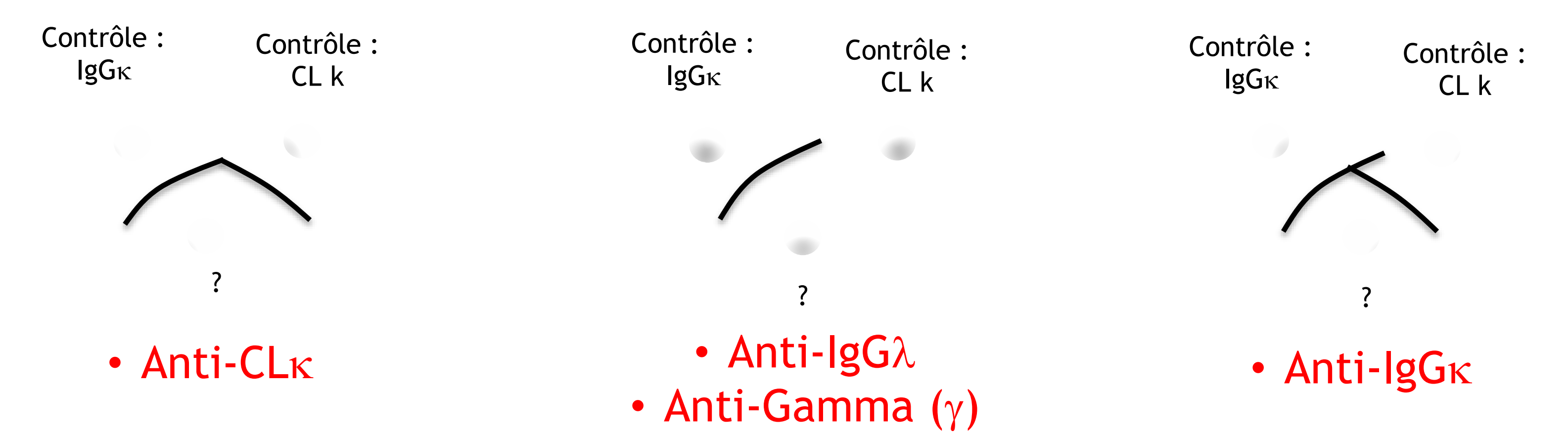
III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

4. TEST D'OUCHTERLONY

Exercice

Quatre (04) immuns sérums ont été préparés, puis testés avec deux solutions antigéniques (une IgGκ et une chaine légère κ). Déterminez dans chaque cas l'immun sérum a été testé :

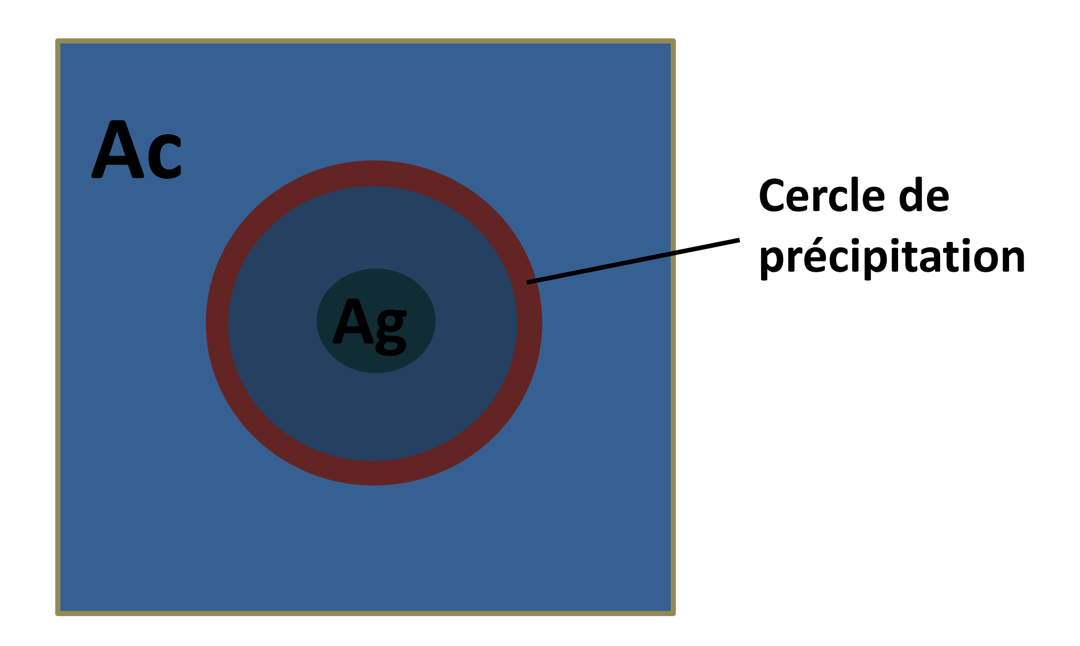
- Anti-IgGκ
- Anti-CLκ
- Anti-IgGλ
- Anti-Gamma (γ)



III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

5. Technique de Mancini

Diffusion simple → Immunodiffusion radiale



Diamètre² proportionnel à la [Ag]

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

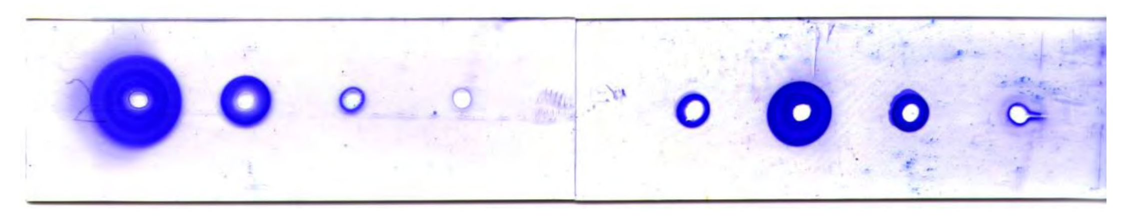
5. Technique de Mancini

Principe: technique d'immunoprécipitation quantitative qui consiste en la diffusion **passive** et **radiale** de la proteine à doser au sein d'un **gel incorporé** d'Immun sérum spécifique de cette protéine et formation de cercle de précipitation aux zones d'équivalence.

Le diamètre du cercle est proportionnel à la concentration de la protéine.

L'utilisation d'étalons de concentrations connues permet d'établir une courbe d'étalonnage.

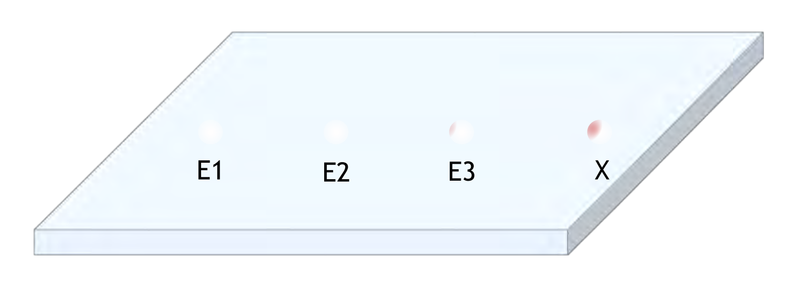
Application : Le dosage des protéines (ex. faire le profil protéique sérique)

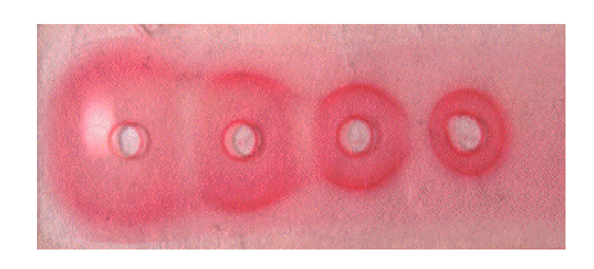


III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

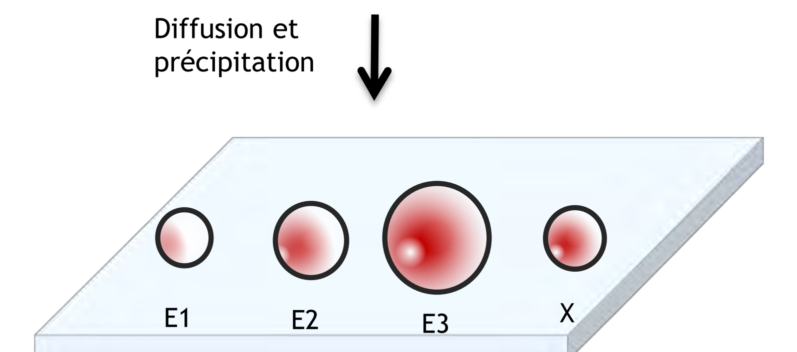
5.IMMUNODIFFUSION RADIALE SIMPLE (Mancini)

Gel contenant un Immun-sérum monospécifique

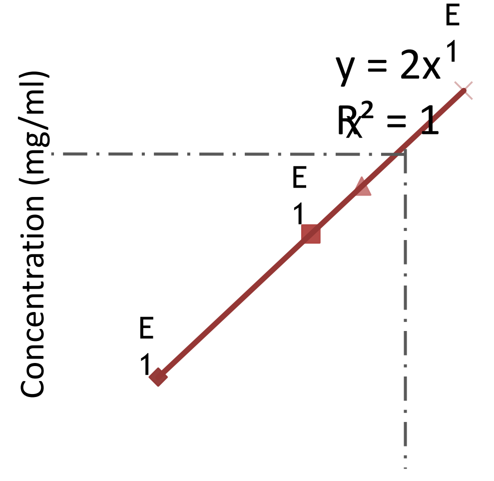




Diffusion et précipitation



Apparition d'anneaux de précipitation



inconvénient : devoir attendre au moins 18 heures pour que le précipité se forme, de plus la précision de la méthode est faible.

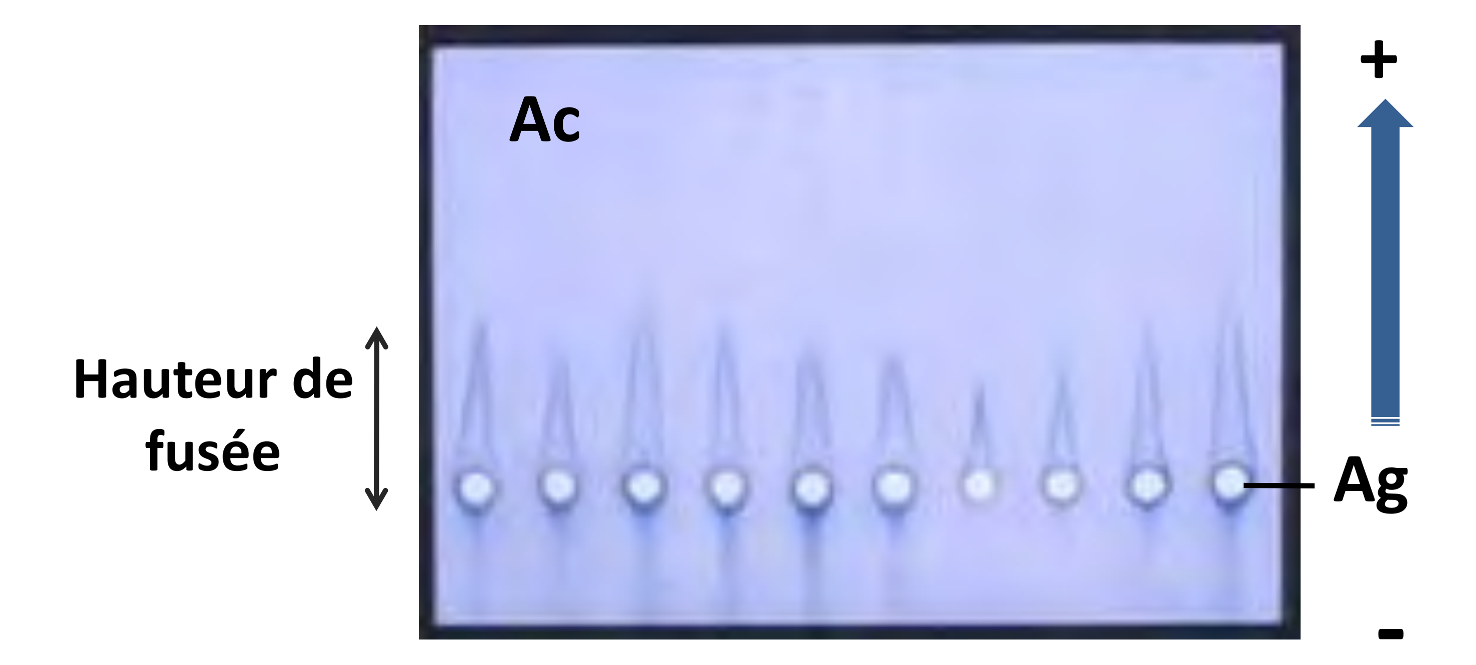
Sensibilité: 50mg/l

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

6.ELECTRO-IMMUNO-QUANTIFICATION DE LAURELL OU ELECTROPHORESE EN FUSEE (ROCKET)

Diffusion simple

immunoélectrophorèse en fusées



III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

6.ELECTRO-IMMUNO-QUANTIFICATION DE LAURELL OU ELECTROPHORESE EN FUSEE (ROCKET)

Proche de la technique de Mancini, la diffusion de l'antigène est accélérée par un champ électrique. Le gel est incorporé.

La migration se fait dans une seule direction, et le précipité ressemble à *une fusée* (rocket) ou à une *flamme* .
La hauteur du précipité est proportionnelle à la concentration de l'antigène.
La mesure de cette concentration se fait par extrapolation à partir d'une courbe d'étalonnage.

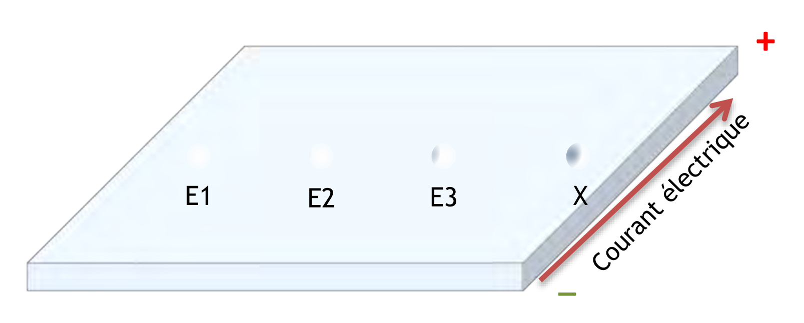
Application: Des **facteurs de la coagulation** sont dosés par cette méthode.
dosage des protéines:
(ex. faire le profil protéique sérique)
Le résultat est accessible en quelques heures.

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

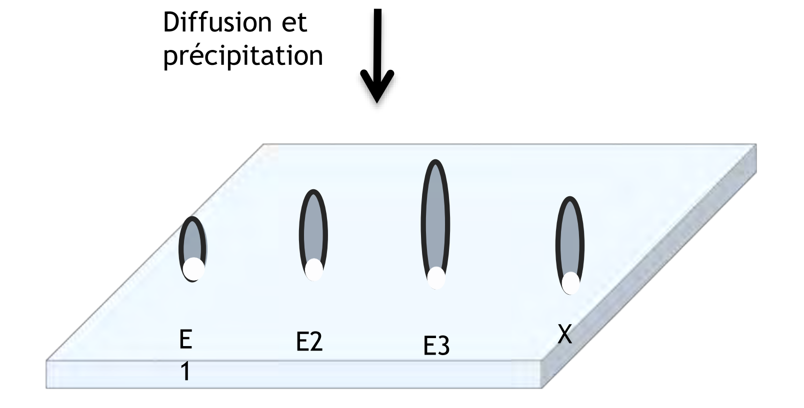
6. ELECTROIMMUNOQUANTIFICATION (LAURELL)

Decrite initialement par Laurell en 1966

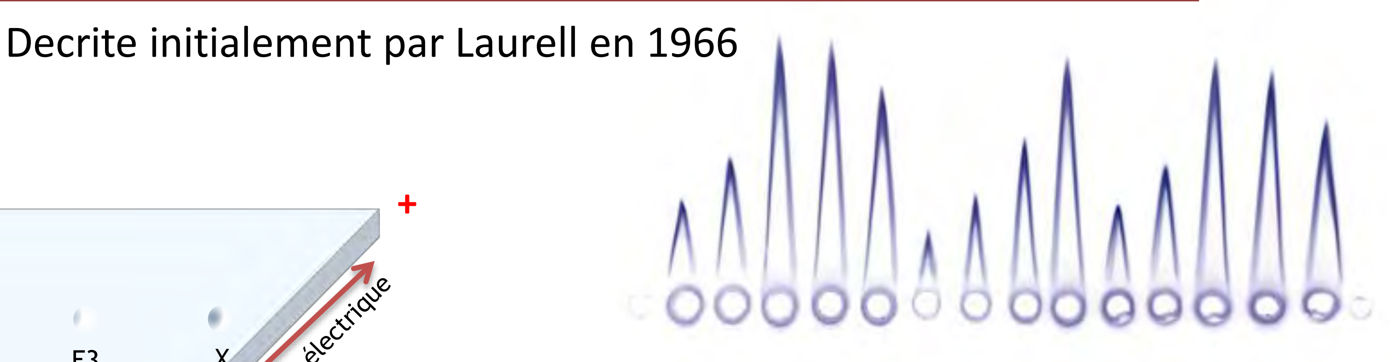
Gel contenant un Immun-sérum monospécifique

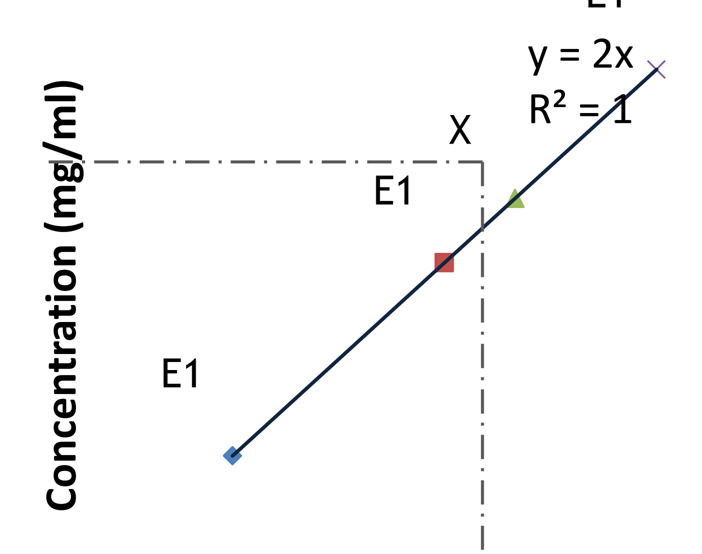


Diffusion et précipitation



Apparition d'obus, pics ou « rokets »



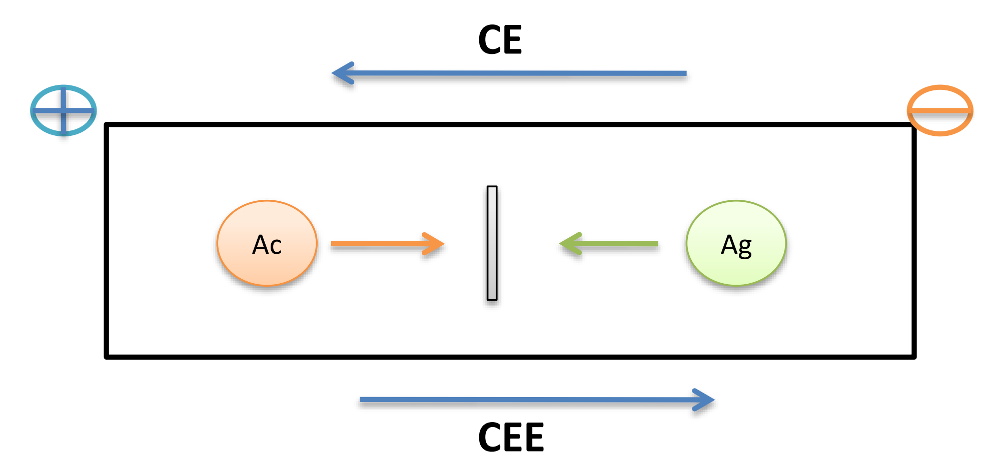


résultat quantitatif est obtenu en 4 heures.

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

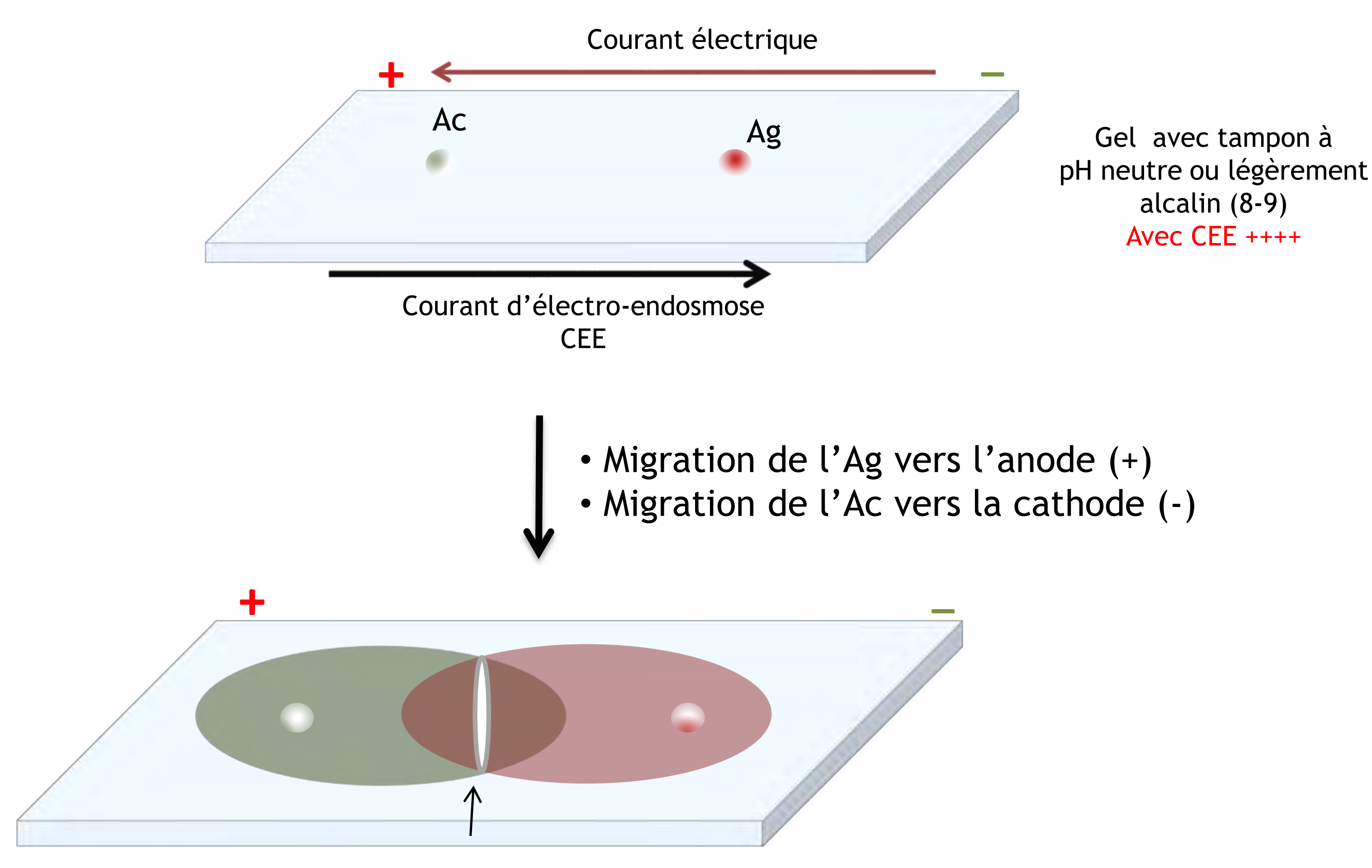
7. Contre-immunoélectrophorèse ou Electrosynérèse

- **Principe:** technique qualitative d'immunoprécipitation en gel vièrge ou la diffusion de l'Ag et de l'Ac est accélérée par un courant électrique (CE).
- **Support:** gel d'agarose à fort effet d'électro-endosmose (EEE).
- Ag et Ac migrent rapidement à la rencontre l'un de l'autre
- Au niveau des zones d'équivalence, la réaction Ag-Ac conduit à la formation d'un arc de précipitation.



III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

7. Contre-immunoélectrophorèse ou Electrosynérèse



Gel avec tampon à pH neutre ou légèrement alcalin (8-9)
Avec CEE ++++

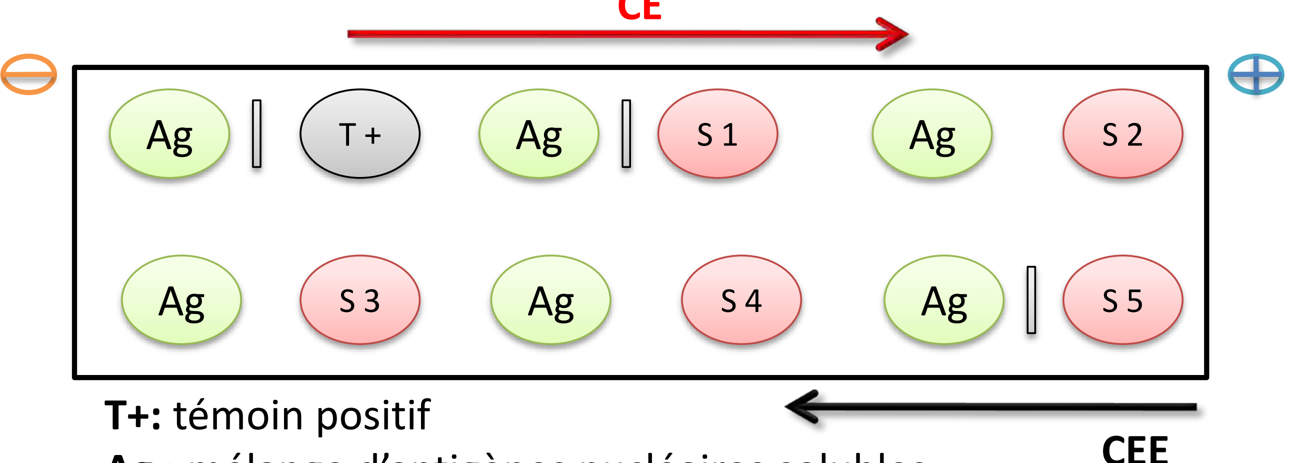
- Migration de l'Ag vers l'anode (+)
- Migration de l'Ac vers la cathode (-)

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

7. Contre-immunoélectrophorèse ou Electrosynérèse

Applications:

Cette technique a été proposée au début pour la détection de l'Ag associé à l'hépatite B (Ag HBs) ou celle des Ac correspondants (marqueurs de l'hepatite-B), ainsi que pour la mise en évidence d'auto-Ac spécifiques de différents Ag solubles du noyau.



T+: témoin positif
Ag : mélange d'antigènes nucléaires solubles.
S1, S2….: sérums des malades

recherche d'auto anticorps anti- antigènes nucléaires solubles (SSA, SSB, Sm, RNP…)

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

8. Immunoélectrophorèse

Solutions antigéniques trop complexes



Techniques en deux temps

- Electrophorèse: séparation des fractions antigéniques
- Immunoprécipitation

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

8. Immunoélectrophorèse

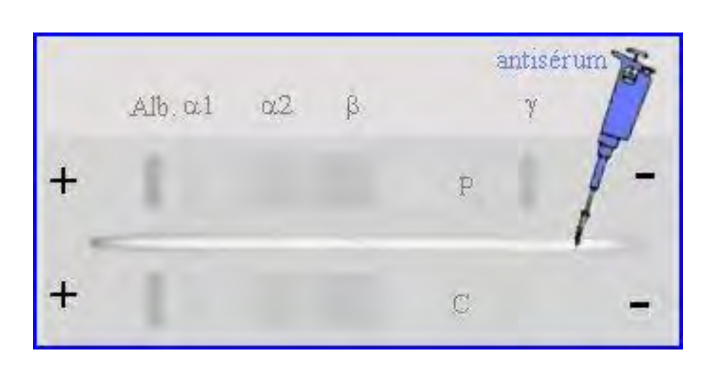
Cette technique renforce le pouvoir analytique des doubles diffusions en identifiant les constituants d'un mélange par 2 propriétés indépendantes, leur mobilité électrophorétique et leur spécificité antigénique.

Premier temps

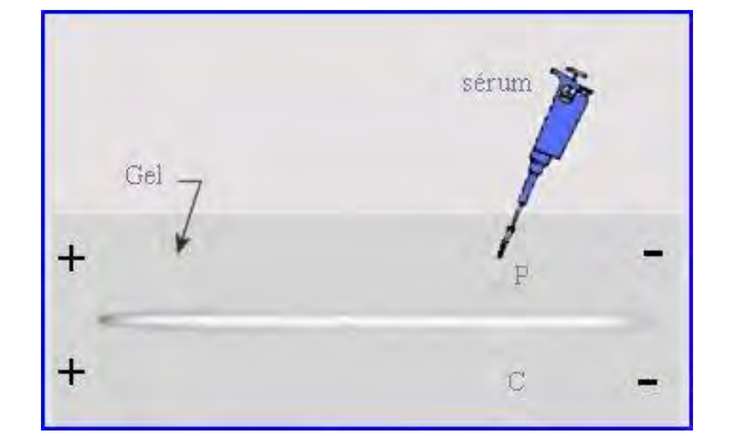
mobilité électrophorétique

deuxieme temps

spécificité antigénique

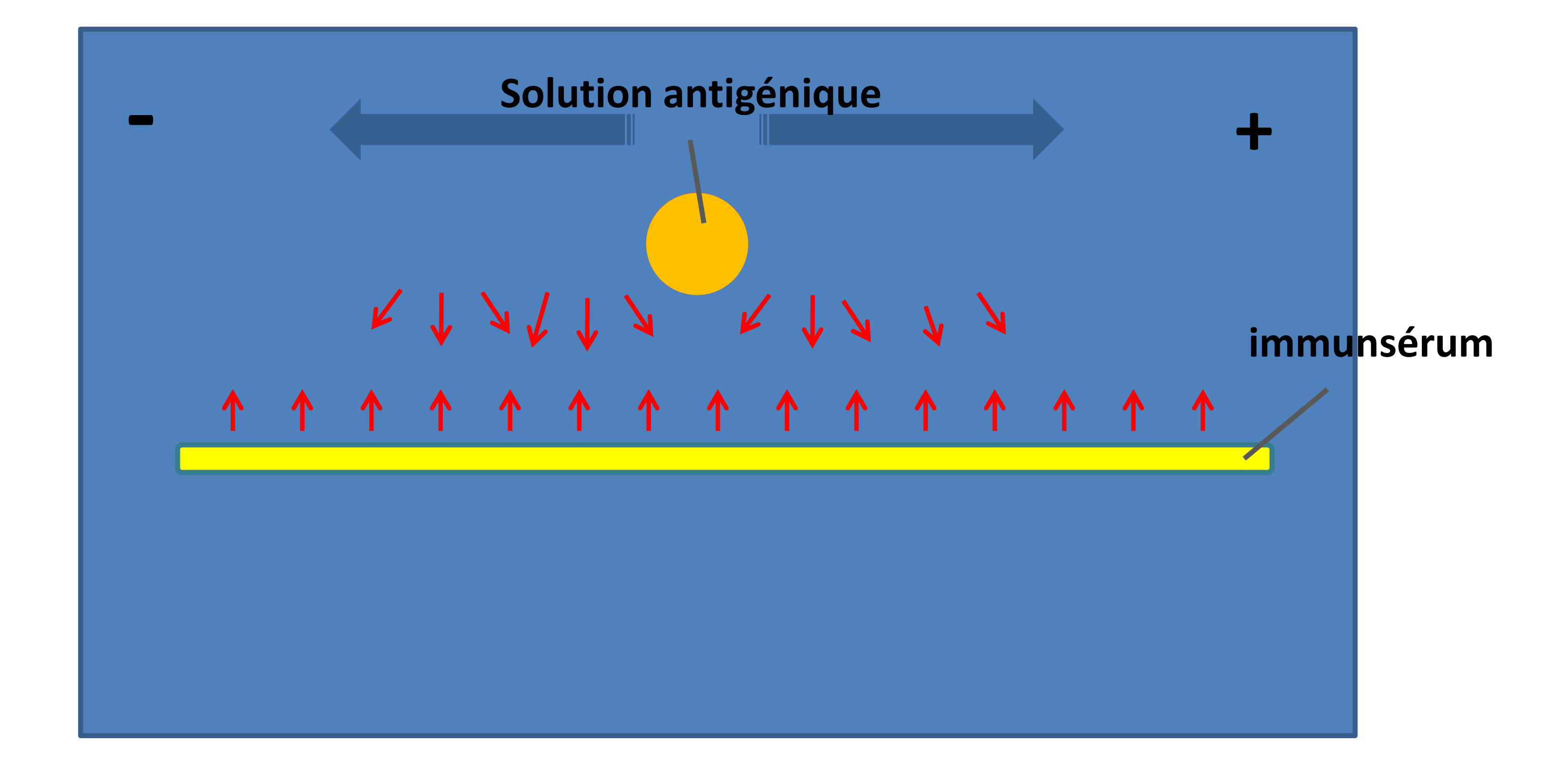






III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

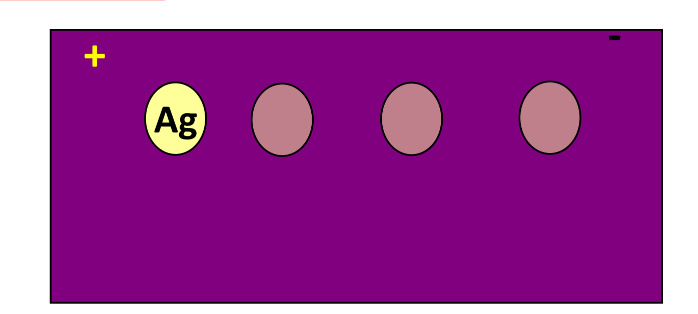
8. Immunoélectrophorèse



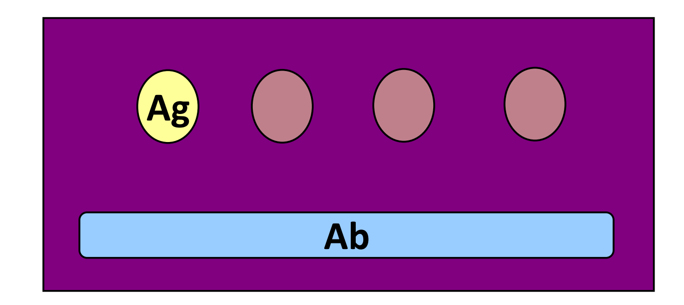
III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

8. Immunoélectrophorèse

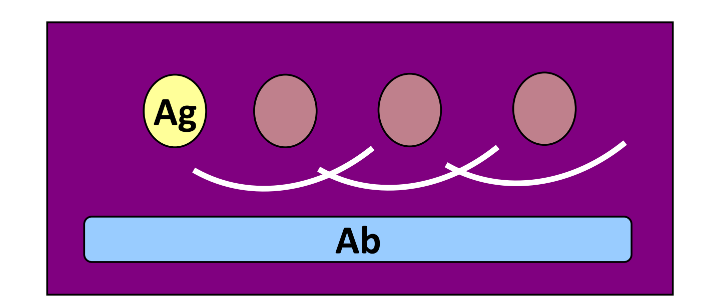
Dans un premier temps, les molécules antigéniques sont séparées grâce à leur différence de mobilité dans un champ électrique.



Dans un deuxième temps, lorsque la séparation est jugée suffisante, un antisérum est placé dans une rigole parallèle au sens de migration des Ag.



Ag et Ac diffusent librement dans le gel et donnent des arcs (lignes) de précipitation selon le même principe que l'immunodiffusion d'Ouchterlony..



III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

8. Immunoélectrophorèse

Cette technique est hautement discriminative et a permis la mise en évidence de plus de 30 molécules antigéniques différentes dans le sérum humain en utilisant comme Ac un sérum animal antisérum humain.

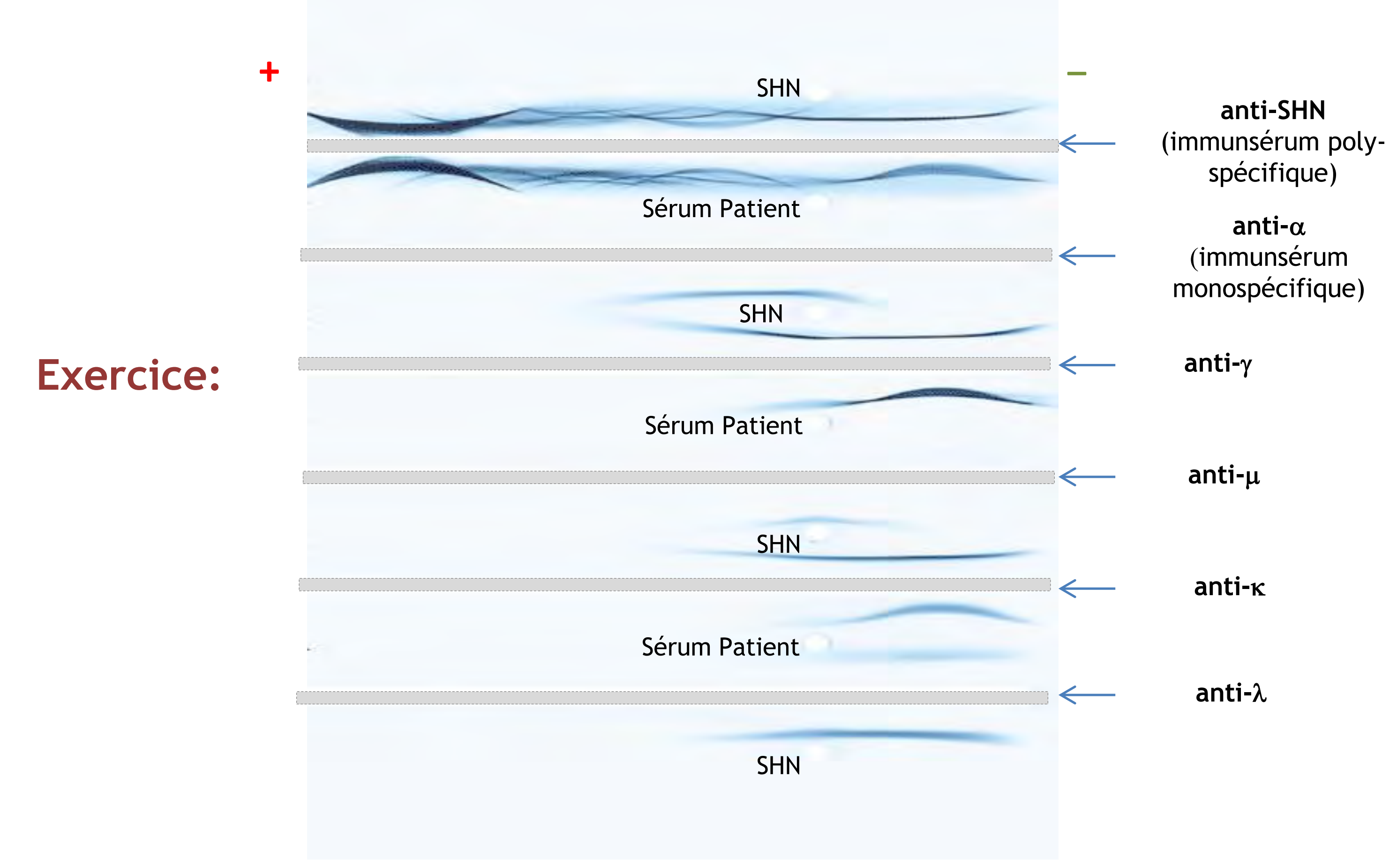
Applications:

elle se prête à une étude semi-quantitative des concentrations d'Ag et permet l’identification d’un composant monoclonal (préciser la classe et la sous-classe des Ig monoclonales en cas d’immunoglobulinopathies monoclonales).

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

8. Immunoélectrophorèse

L'immunoélectrophorèse du sérum d'un patient ayant une gammapathie monoclonale (présence d'une immunoglobuline monoclonale) donne les résultats suivants, interprétez ces résultats



Présence d'une immunoglobuline monoclonale d'isotype IgGk avec un déficit en IgA et IgM (extinction clonale)

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

9. Immunofixation

- **Principe:** technique immunochimique qualitative

  en deux temps:

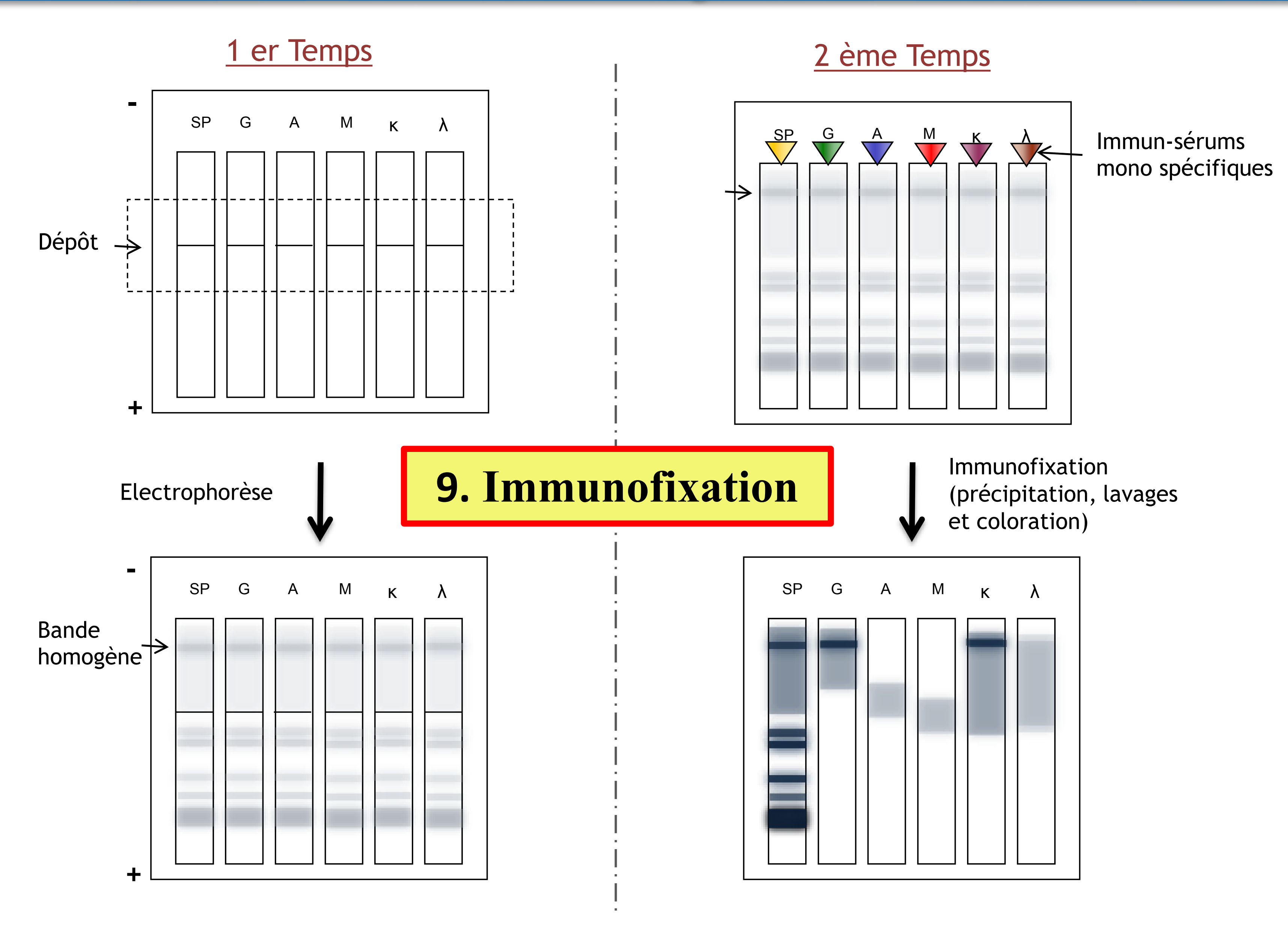
  1. séparation électrophorétique.
  2. Immunoprécipitation par des immun-sérums monospécifiques suivit d'une coloration.

- **Application:**

mettre en évidence la nature et de préciser le typage d'une immunoglobuline monoclonale (myélome…) décelés à l 'électrophorèse des protéines sériques/urinaires.

Méthode plus sensible et plus rapide que l'immunoélectrophorèse.

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié



III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

9. Immunofixation

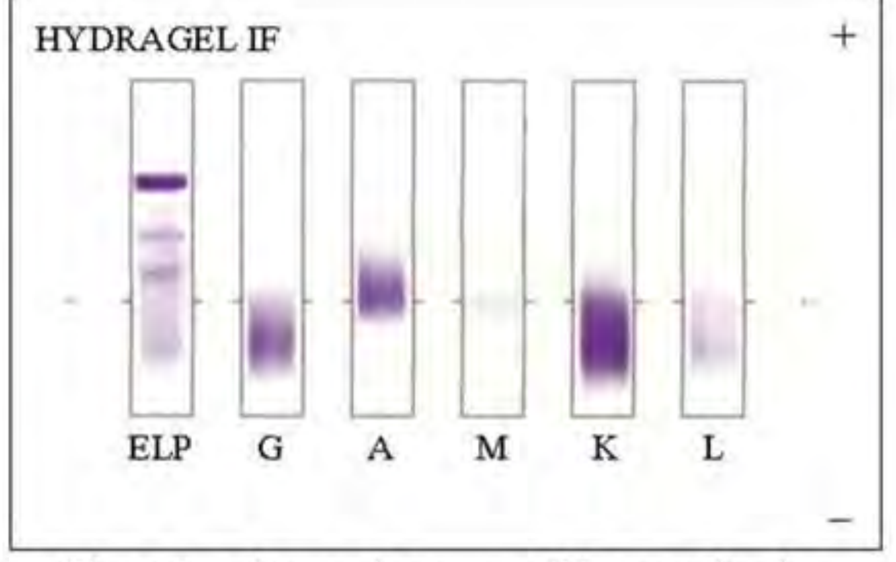


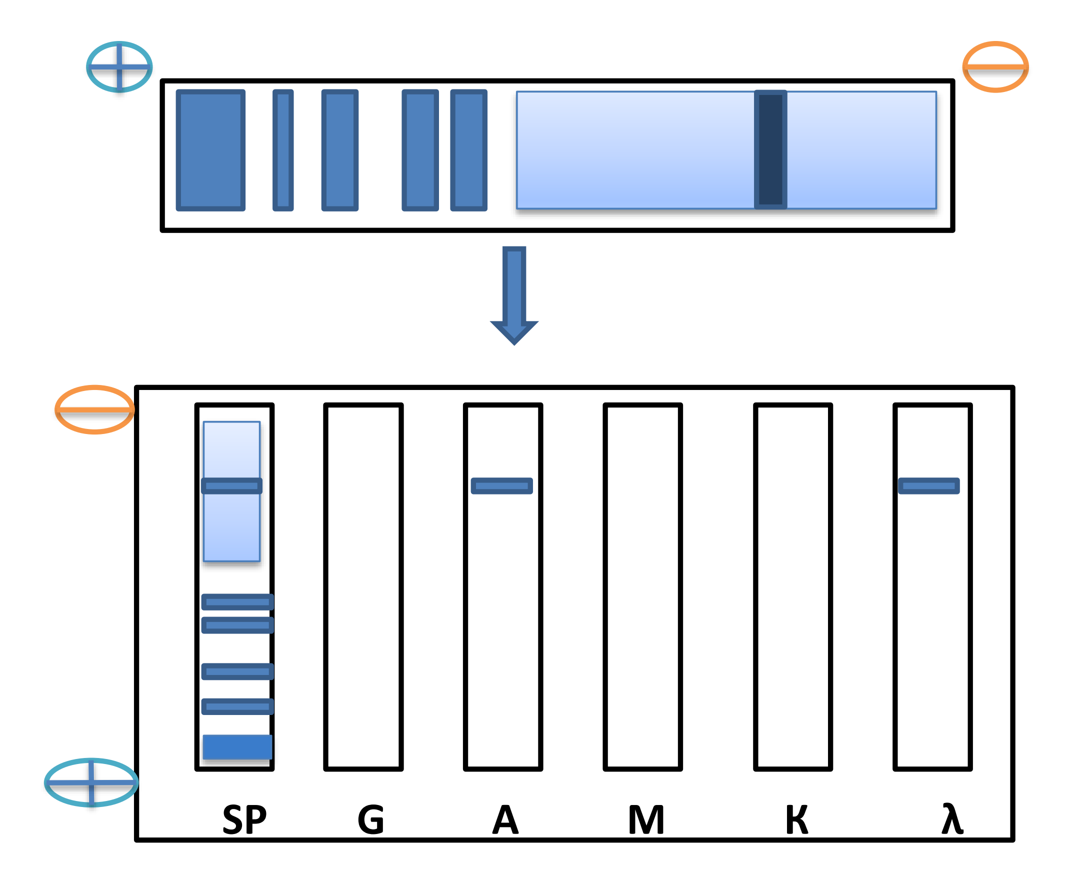
Figure 3a : absence de gammapathie monoclonale

HYDRAGEL IF
+
ELP G A M K L
–

Figure 3b : gammapathie monoclonale de type IgG lambda

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

9. Immunofixation



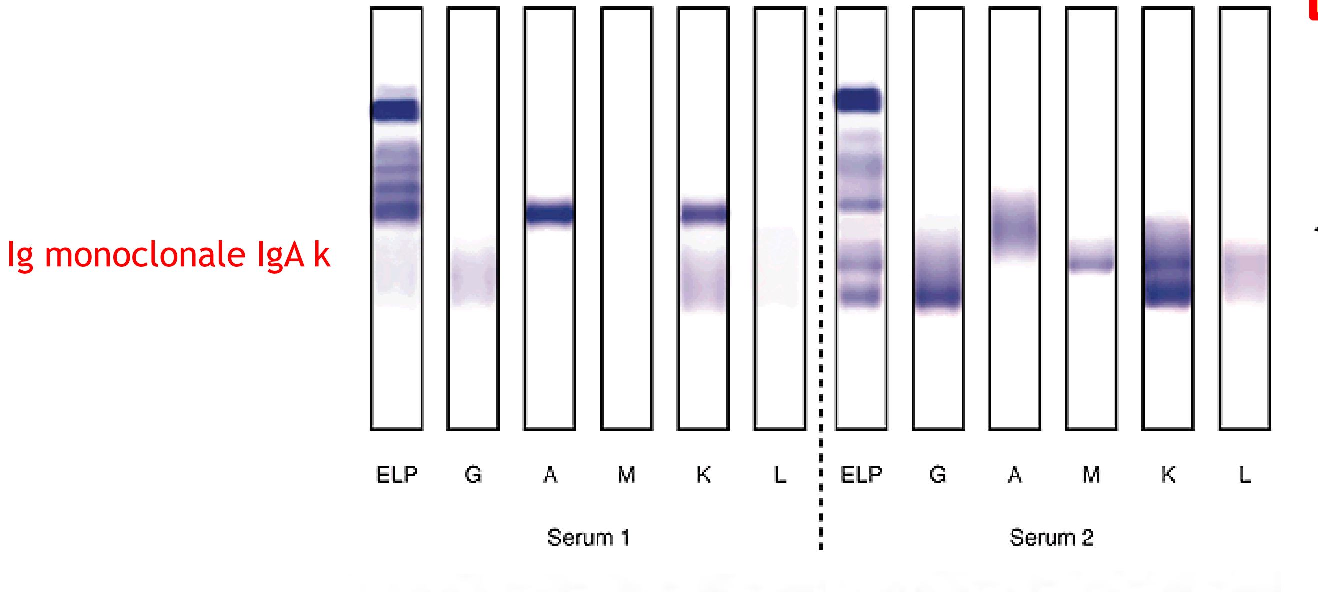
Composant monoclonal d'isotype IgA à chaines légères λ

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

9. Immunofixation

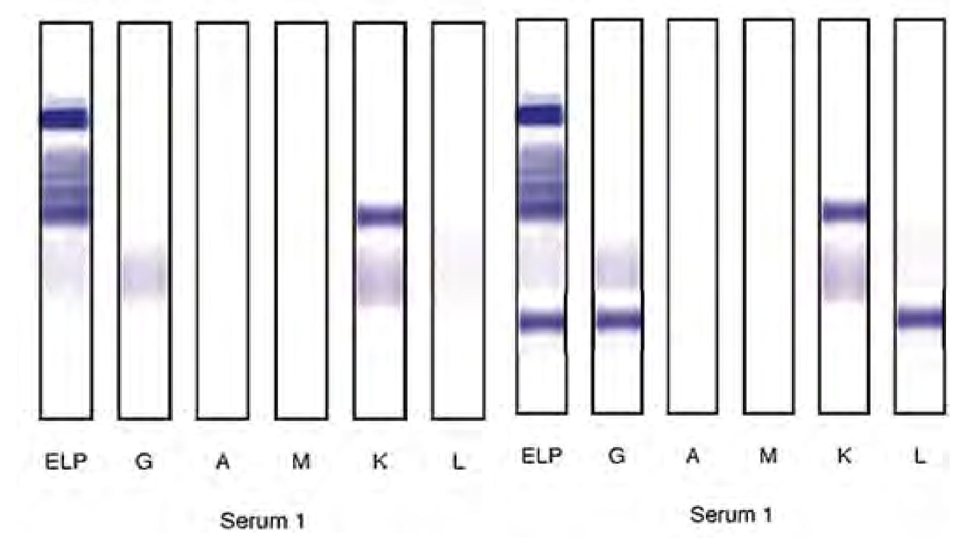
Interprétez les immunofixations sériques suivantes :

Ig monoclonale IgA k



Biclonal:
Ig monoclonale IgG k
Ig monoclonale IgM k

CL k
Ou
IgD k
Ou
IgE k



Biclonal:
IgG λ
+
CL k
Ou
IgD k
Ou
IgE k

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

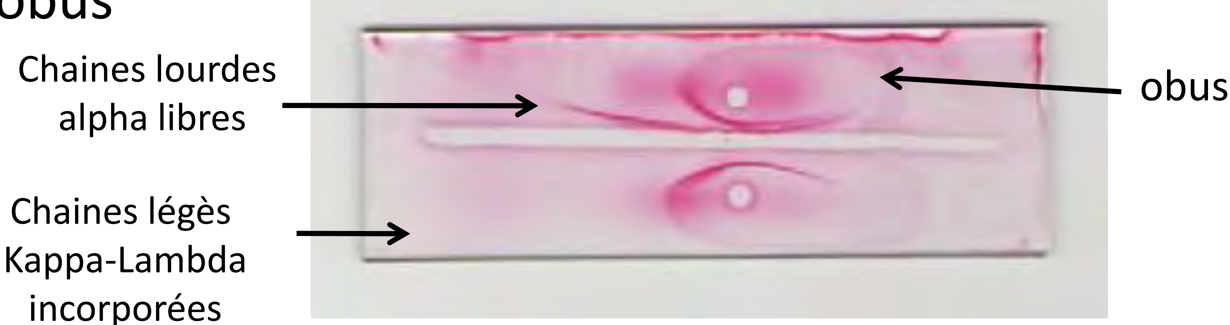
10. Immunoselection

- Principe: varient d'immunielectrophorese

Cette technique permet la détection de chaînes lourdes libres présentes en faible quantité dans des liquides biologiques.

Les chaînes lourdes libres vont migrer et pourront être identifiés dans un second temps par immunodiffusion en utilisant un immun sérum spécifique

Le gel est incorporé d'anti-chaînes légères Kappa et Lambda en quantité optimale, ces Ac précipiteront les Ig entières sous forme de « rockets » ou obus



III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

10. Immunoselection

Anti-G, M, A, K, L.

Gel vierge

−
+

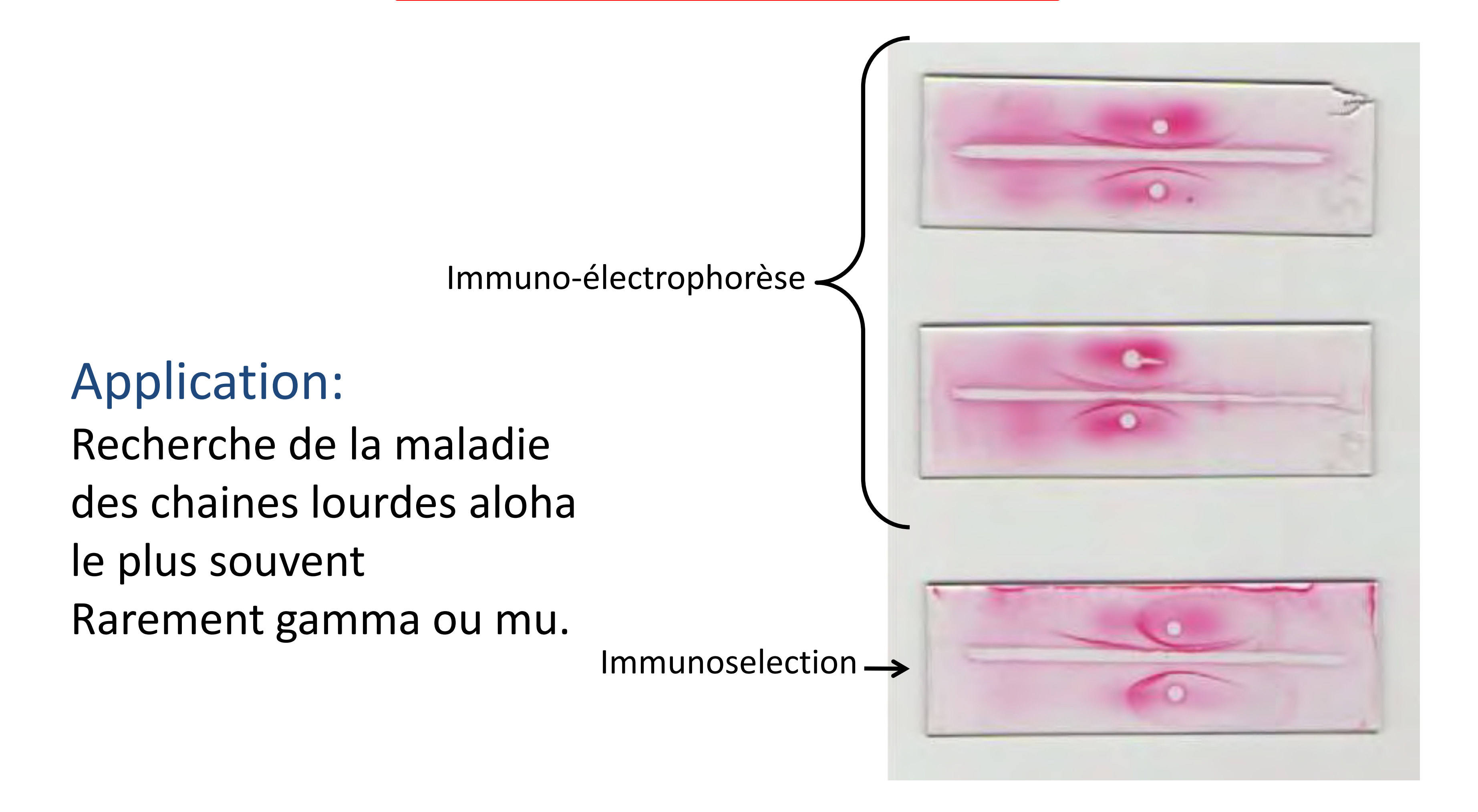
Anti-A.

Gel incorporé (Anti-K + Anti-L)

−
+

III. Techniques de précipitation
2. En milieu gélifié

10. Immunoselection

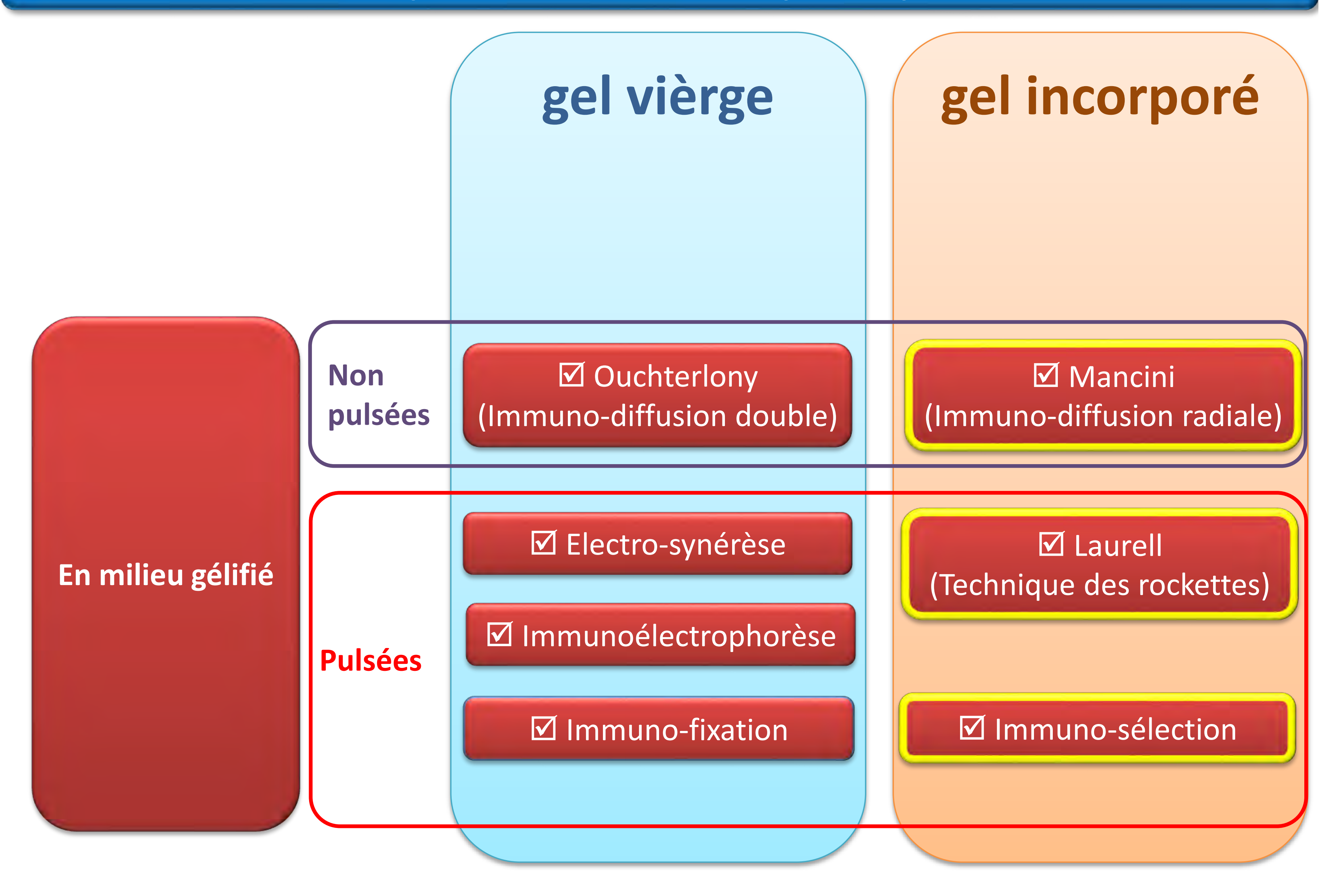


Application:

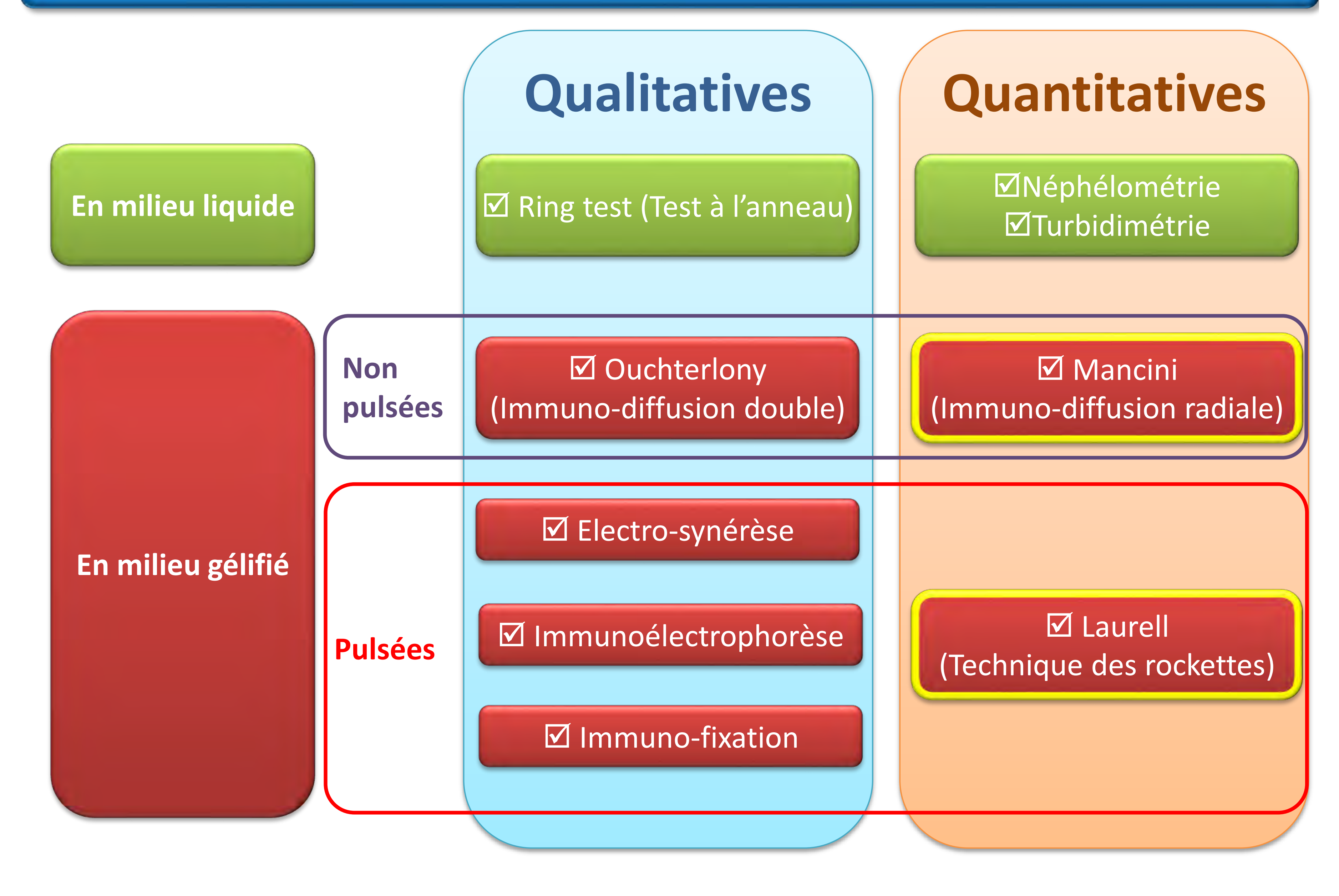
Recherche de la maladie des chaines lourdes aloha le plus souvent

Rarement gamma ou mu.

Techniques d'immuno-précipitation



Techniques d'immuno-précipitation



IV. Réactions d'agglutination

IV. Dréactions d'agglutination

Les aspects

Tapis

Bouton



Hommogène



Agglutinat



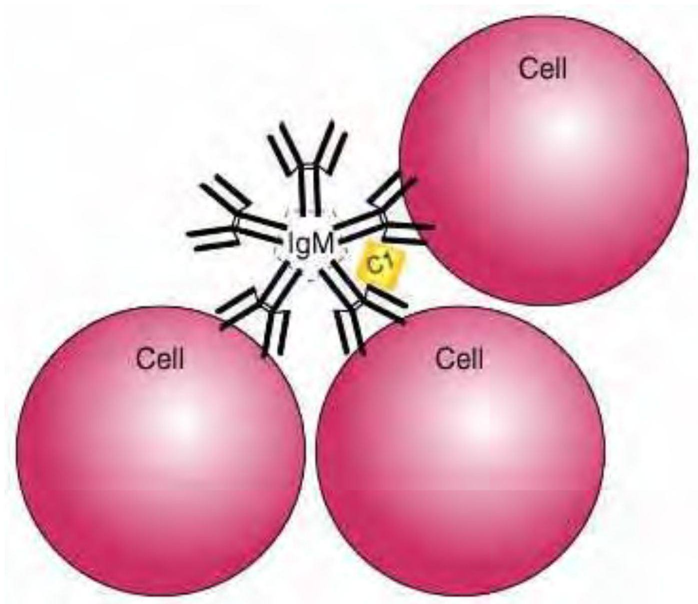
l'antigène est ***particulaire*** ou ***cellulaire*** (bactéries, hématies, billes de latex …); les complexes immuns forment un **agglutinat**.

Observation directe des effets de la réaction Ag-AC (visible à l'œil nu)

A-2:Agglutination:

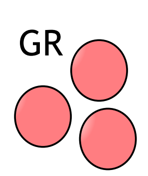
1 – Principe:

Les réactions d'agglutination mettent en jeu un Ag situe a la surface d'une ***particule*** de taille comprise entre le dixième et la dizaine de micron (globules rouges, globules blancs, plaquettes, spermatozoïdes, micro-organismes, billes de latex ou de sépharose). C'est un phénomène complexe au cours duquel les Ac s'unissent aux Ag portés par la particule formant ainsi des ponts spécifiques entre ces particules permettant leur réunion en **amas.**

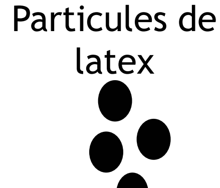


IV. Dréactions d'agglutination

GR

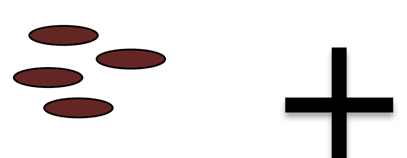


Particules de latex





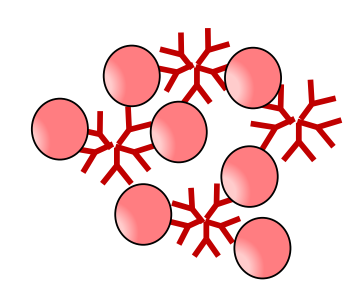
Bactérie



Ag présent à la surface d'une particule

Ac agglutinant :
IgM ++++
IgG +

Hémagglutination

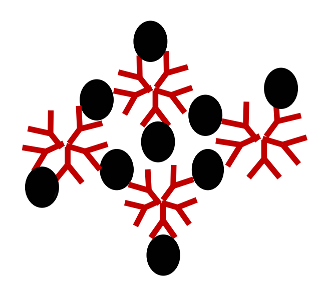




Réaction Positive — Réaction Négative



Agglutination









Réaction Positive — Réaction Négative

IV. Dréactions d'agglutination

Les paramètres de réaction

- Les **Ac dits agglutinants** (IgM en majorité) sont capables de produire une agglutination des particules en suspension dans un milieu salin de [Na Cl] = 0,15 M.
- dits **non-agglutinants** sont incapables de provoquer une agglutination dans ces conditions (IgG).
- **Les Ag** : il existe une relation entre l' agglutinabilité et :
- le nombre de sites antigéniques.
- leur localisation .

L'agglutination est utilisée comme un ***test qualitatif*** de la présence d'anticorps dans le sérum sanguin et pour déterminer le groupe sanguin.

IV. Réactions d'agglutination

1. Agglutination active ou directe

1- Agglutination active ou directe ou encore:

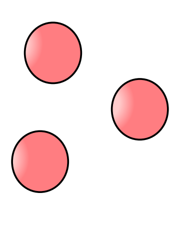
Elle résulte d'une union spécifique entre un ***Ac agglutinant*** et un ***Ag figuré appartenant en propre a la particule*** c'est-à-dire l'Ag est naturellement porté par la particule. Elle peut se faire en tubes, en microplaques ou sur lame et peut être qualitatives ou quantitatives.

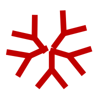
(la derniere dilution du serum ou l'on observe encore une agglutination).

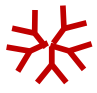
IV. Réactions d'agglutination

1. Agglutination active ou directe

Antigène directement particulaire ex :
hématie, bactérie

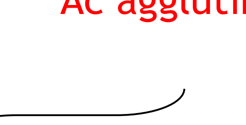


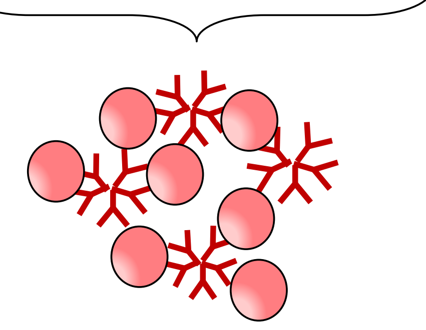




Ag particulaire

Ac agglutinant





Agglutination ou hémagglutination

Exemple d'application :

- Le groupage sanguin
- Sérologies bactériennes (ASLO)
- Test de Coombs direct

IV. Réactions d'agglutination

1. Agglutination active ou directe

Exercice

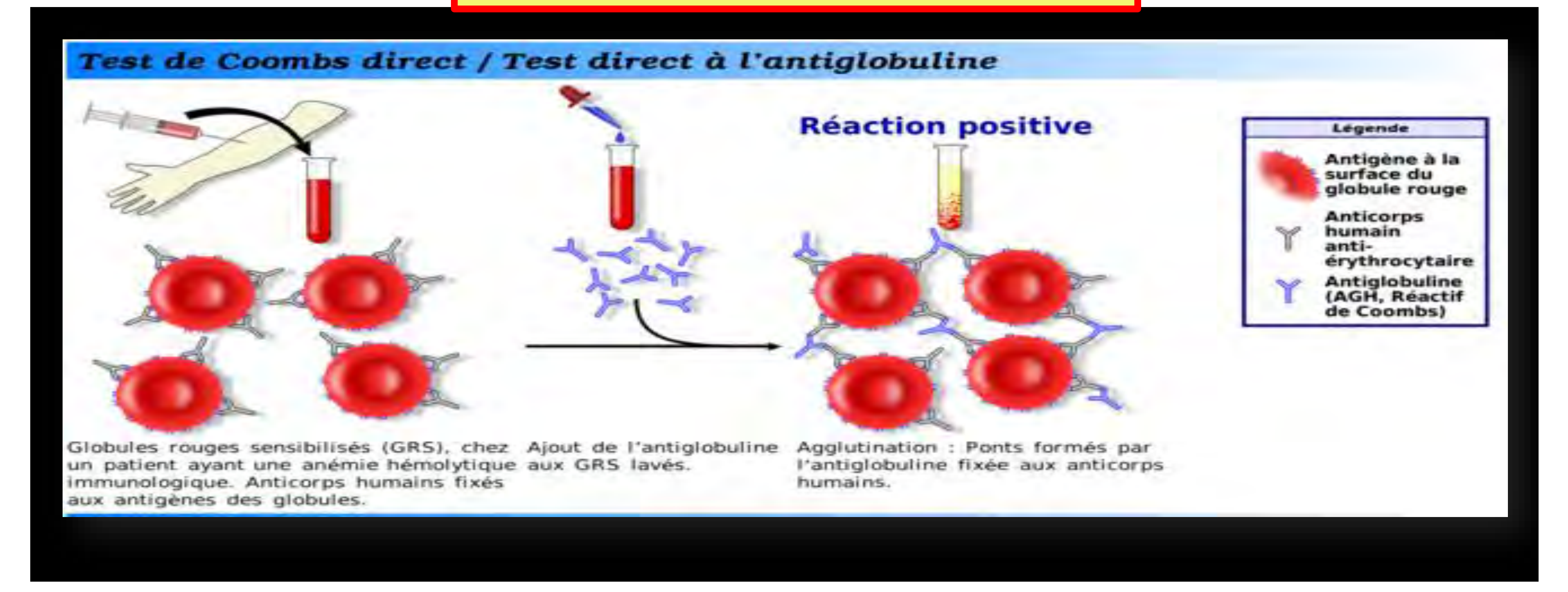
Déterminez les groupes sanguins réalisés par la technique d'hémagglutination active (directe)

	Anti-B	Anti-A	Anti-A+B
Groupe sanguin 1 A			
Groupe sanguin 2 O			
Groupe sanguin 3 B			
Groupe sanguin 4 AB			

IV. Réactions d'agglutination

1. Agglutination active ou directe

Test de Coombs directe

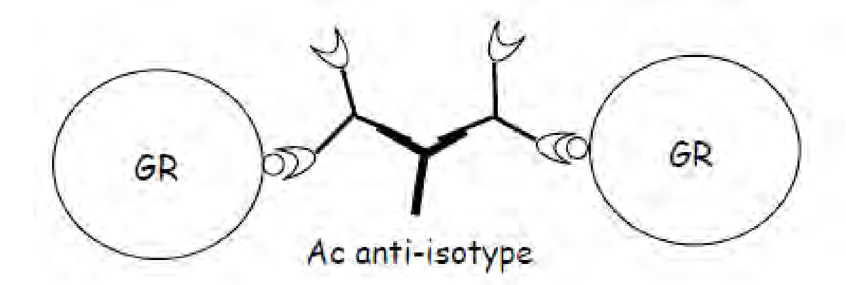


IV. Réactions d’agglutination

2. Agglutination passive ou indirecte

1- Agglutination indirecte ou passive:

Elle se produit entre un Ac non agglutinant et un Ag figuré faisant normalement partie integrante de la particule, en faisant appel a un artifice. De facon generale, on peut obtenir une agglutination avec des Ac non agglutinants.



2- Agglutination passive :

Elle est realisee entre un Ac et un Ag normalement soluble, mais rendu particulaire par adsorbtion ou fixation grâce à un procédé chimique, sur un support :

1. Les billes de latex ; l'Ag est fixe par simple contact (pH 8,2)

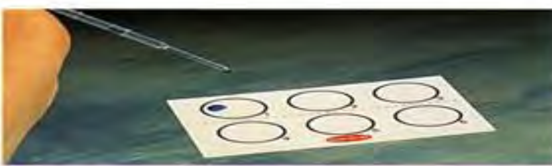
2. Les hematies ; l'Ag est fixe par simple contact, par traitement a l'acide tannique, par fixation chimique (glutaraldehyde, di-nitro chloro-benzene…) ou par fixation immunologique (cas des Ac diriges contre des epitopes du GR).

Ac anti-isotype

PROCEDURE



1 Shake Test Reagent vigorously and dispense one drop onto test circle.



2 Add one drop of saline to test circle, ensuring not to mix with Test Reagent.



3 Using a sterile loop select a portion of the colony to be tested and emulsify in saline drop.



4 Mix Test Reagent and Suspension.



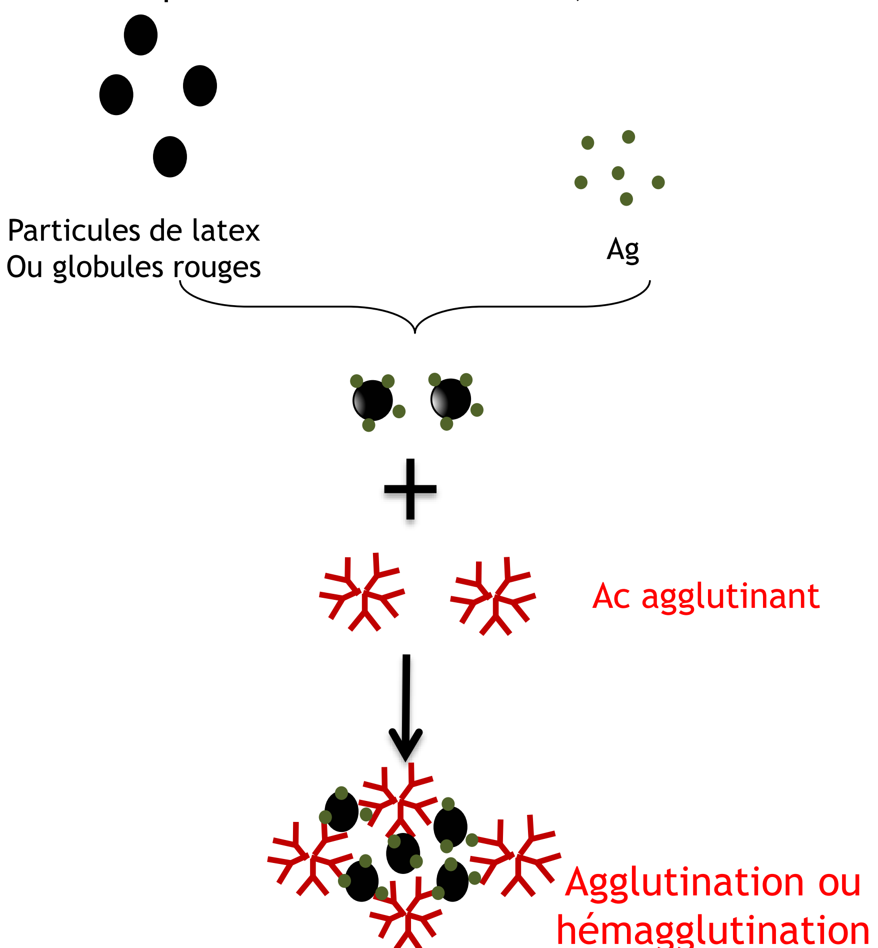
5 Rock Reaction Card in a circular motion for up to one minute and observe for agglutination. Repeat procedure with other NSF colonies or Control Latex reagent where appropriate.



6 On completion of tests, dispose of reaction card safely into disinfectant.

IV. Réactions d'agglutination

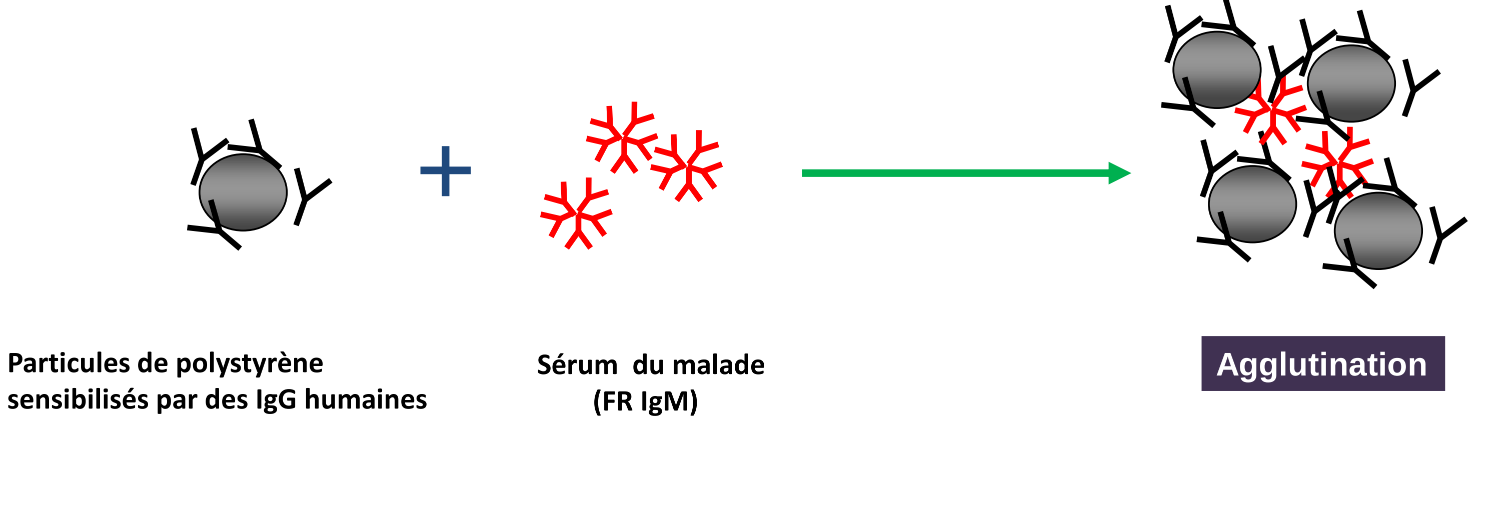
2. Agglutination passive ou indirecte

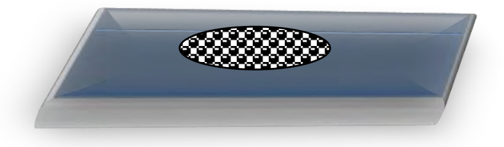


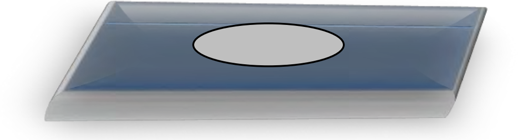
Exemple d'application :

- Test de Coombs indirect
- Test du latex
- Test de Waaler-Rose

Test au latex: technique qualitative







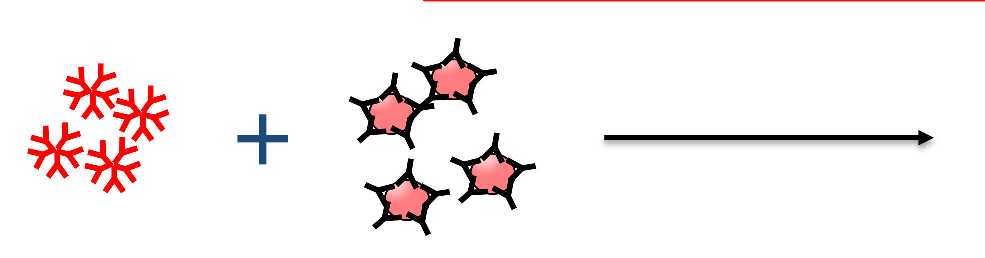
Réaction positive

Réaction négative

IV. Réactions d'agglutination

2. Agglutination passive ou indirecte

Exemple : test du Waaler-Rose



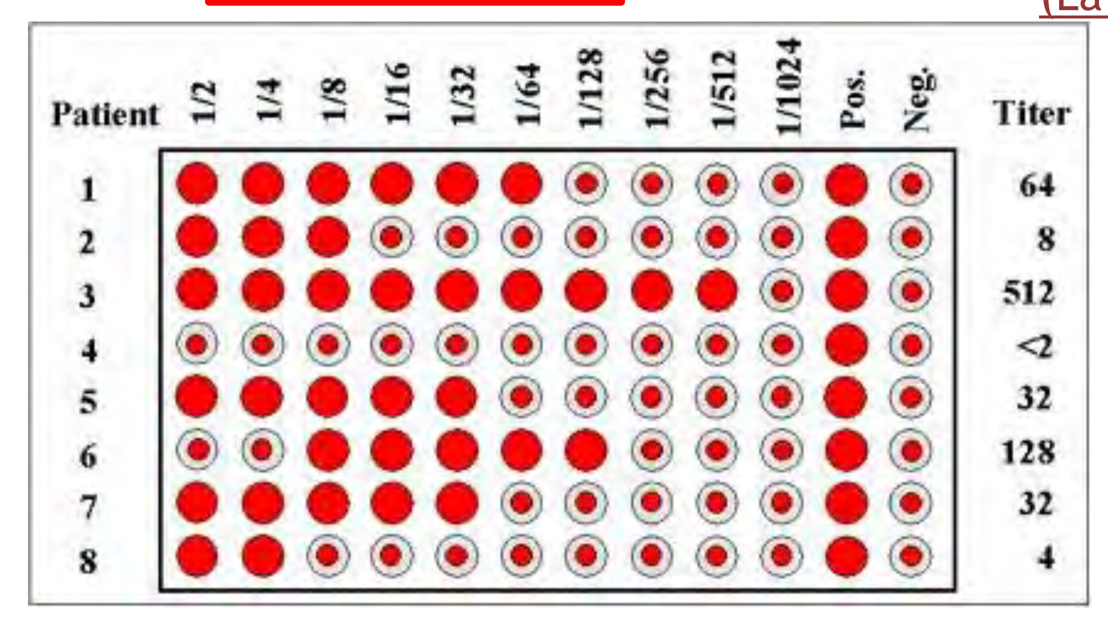
Sérum du malade (FR IgM)

GR O Rh Neg humains sensibilisés par des Ac de lapin anti-GR humains

Hémagglutination

La titration

LES REACTIONS D'AGGLUTINATION INDIRECTE (La titration)



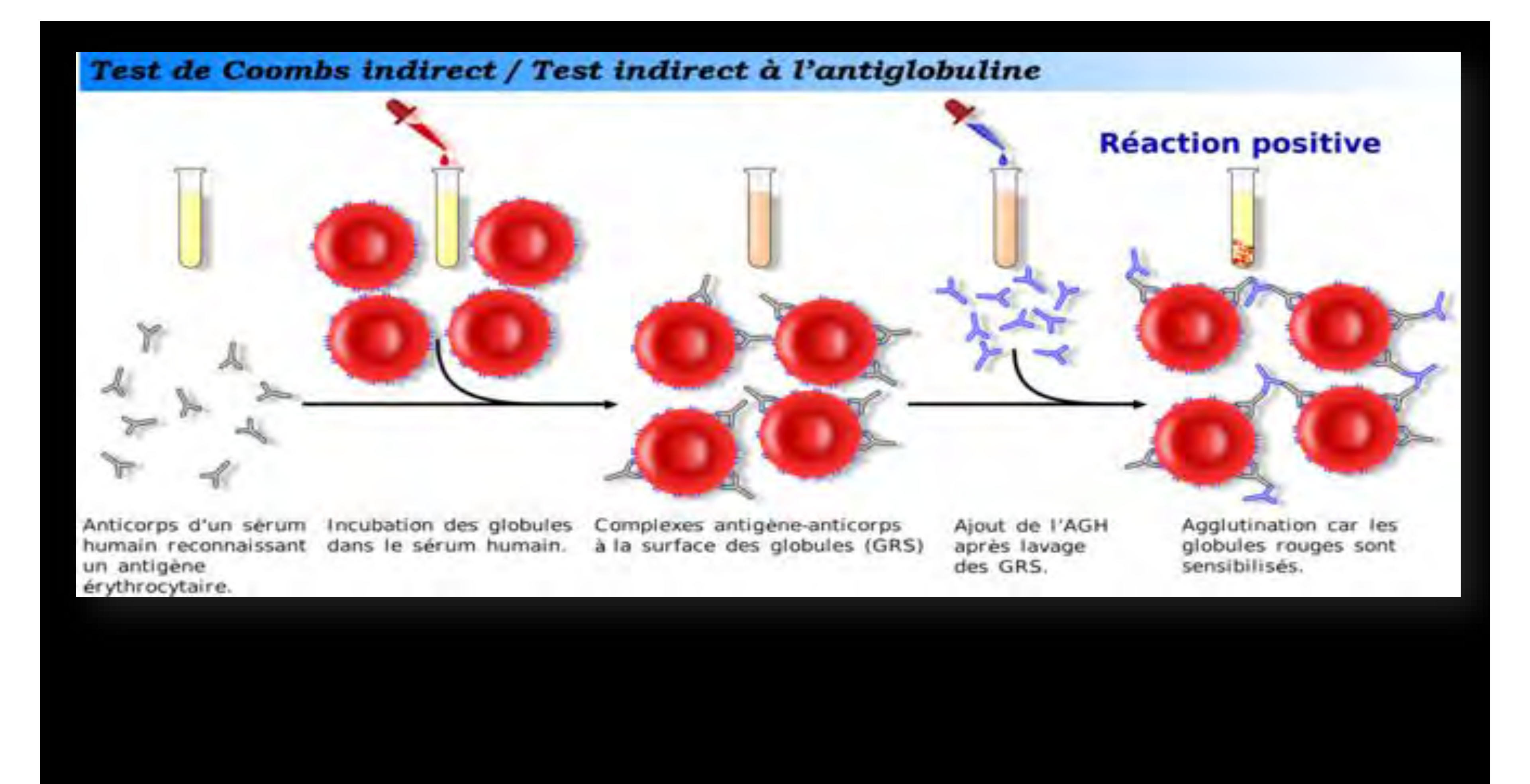


Réaction Positive Réaction Négative

Titre : l'inverse de la plus grande dilution donnant encore une réaction positive

IV. Réactions d'agglutination

Test de Coombs indirecte



IV. Réactions d'agglutination

3. Inhibition d'agglutination passive

Antigène est préalablement fixé sur une particule inerte ex : latex, hématie

paritcules de latex Sensibilisées par β–HCG

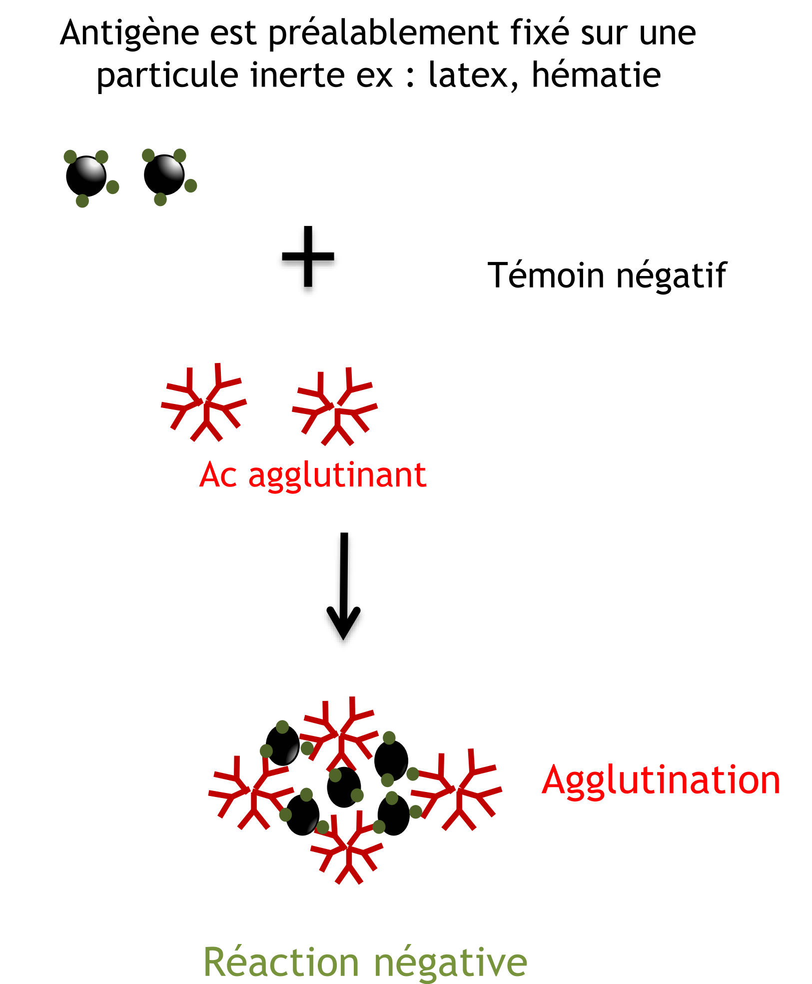
+

Sérum ou urine de la patiente (β–HCG)

Ac agglutinant (anti β–HCG)

Pas d'agglutination

Réaction Postitive



Exemple d'application : test de grossesse.

Applications d'agglutination passive:

2- Réaction d'inhibition d'agglutination (agglutination passive):
test de grossesse, detection de l'hormone gonadotrophine chorionique (HGC) dans l'urine ; GR recouverte d'hormone mise en
contact des Ac anti-HGC et l'urine de la femme suspectee d'etre enceinte. Les [GR-HGC] et [Ac anti-HGC] sont optimums pour l'agglutination.

Agglutination	Oui	Non
HGC dans l'urine	Non	Oui
Réaction	Equilibre	Excès d'Ag
	♀ non enceinte	♀ enceinte

Applications:

•diagnostic des anémies hémolytiques auto-immunes (coombs direct et indirect)

maladies hemolitiques du nouveau né

•Détection des facteurs rhumatoïdes : réaction de latex et Waaler-Rose.

•Détection des autoanticorps antithyroïdiens : thyroperoxydase, thyroglobuline.

•Diagnostic de la syphilis *treponema pallidum hemagglutination* (TPHA) et *veneral disease research laboratory* (VDRL).

Sensibilités comparées des techniques :

* Concentrations minimales d'**Ag détectables** pour 1 Ag de 50 kDa

Tests	**Ag mg/ml**
Précipitation en milieu gélifié*diffusion double (Ouchterlony)	1-10
Précipitation en milieu gélifié*électrocinérèse	0,3-1
Précipitation en milieu gélifié*immunoélectrophorèse	10
Hémagglutination passive	0,001-0,005

IV. Conclusion

Il existe de nombreuses techniques permettant de détecter les antigènes ou les anticorps.
Le **choix de la technique** est fonction de différents paramètres :
- la **concentration** de l'antigène ou de l'anticorps ;
- la **forme de l'antigène** (soluble ou particulaire) ;